

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)

[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 F2000-38-PCT	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP00/03413	国際出願日 (日.月.年) 26.05.00	優先日 (日.月.年) 02.06.99
出願人(氏名又は名称) 株式会社ベッセルリサーチ・ラボラトリー		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 _____ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl' C07K 14/775, G01N 33/92 // C07K 16/18

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl' C07K 14/775, G01N 33/92, C07K 16/18

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JICSTファイル(JOIS), WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP, 9-297137, A (株式会社シノテスト) 18.11月.1997 (18.11.97) ファミリーなし	1-21
Y	Murakami, M et al. "Distinction in the mode of receptor-mediated endocytosis between high density lipoprotein and acetylated high density lipoprotein : evidence for high density lipoprotein receptor-mediated cholesterol transfer", J. Biochem. (1987), Vol. 101, No. 3, p. 729-741	1-21

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

22.08.00

国際調査報告の発送日

05.09.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

六笠 紀子

4 B

9735

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	EP, 663407, A1 (ROTKREUZSTIFTUNG ZENT LAB BLUTSPENDE) 19. 7月. 1995 (19. 07. 95) & US, 5652339, A & NO, 9405101, A & CA, 2138925, A & FI, 9406199, A & CZ, 9403299, A3 & HU, 943830, A & CN, 1108662, A & JP, 7-242699, A	1 - 2 1
A	EP, 617289, A3 (IMMUNO AG) 6. 9月. 1995 (06. 09. 95) & AT, 9300553, A & CA, 2119096, A & JP, 6-300758, A	1 - 2 1
A	Schiele, E. et al. "Feasibility of a recombinant human apolipo- protein E reference material", Fresenius J. Anal. Chem. (1998), Vol. 360 , No. 3/4 , p. 501-504	1 - 2 1

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION
(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner
US Department of Commerce
United States Patent and Trademark
Office, PCT
2011 South Clark Place Room
CP2/5C24
Arlington, VA 22202
ETATS-UNIS D'AMERIQUE
in its capacity as elected Office

Date of mailing: 14 December 2000 (14.12.00)	
International application No.: PCT/JP00/03413	Applicant's or agent's file reference: F2000-38-PCT
International filing date: 26 May 2000 (26.05.00)	Priority date: 02 June 1999 (02.06.99)
Applicant: SHIGEMATSU, Takashi et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:
31 October 2000 (31.10.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer: J. Zahra Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---

P C T

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
[PCT36条及びPCT規則70]


REC'D 20 JUL 2001

WIPO

PCT

出願人又は代理人 の書類記号 F 2 0 0 0 - 3 8 - P C T	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/ I P E A / 4 1 6）を参照すること。	
国際出願番号 P C T / J P 0 0 / 0 3 4 1 3	国際出願日 (日.月.年) 2 6 . 0 5 . 0 0	優先日 (日.月.年) 0 2 . 0 6 . 9 9
国際特許分類 (I P C) Int.Cl ⁷ C 0 7 K 1 4 / 7 7 5, G 0 1 N 3 3 / 9 2, // C 0 7 K 1 6 / 1 8		
出願人 (氏名又は名称) 株式会社ベッセルリサーチ・ラボラトリー		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条 (PCT36条) の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で <u>3</u> ページからなる。 <input type="checkbox"/> この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。 (PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照) この附属書類は、全部で <u> </u> ページである。
3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。 I <input checked="" type="checkbox"/> 国際予備審査報告の基礎 II <input type="checkbox"/> 優先権 III <input type="checkbox"/> 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成 IV <input type="checkbox"/> 発明の単一性の欠如 V <input checked="" type="checkbox"/> PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明 VI <input type="checkbox"/> ある種の引用文献 VII <input type="checkbox"/> 国際出願の不備 VIII <input type="checkbox"/> 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 3 1 . 1 0 . 0 0	国際予備審査報告を作成した日 1 2 . 0 7 . 0 1	
名称及びあて先 日本国特許庁 (I P E A / J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 新見 浩一	4 B 9 1 6 2 
		電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
 PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 _____ 項、 出願時に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 _____ ページ/図、 出願時に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性(N)

請求の範囲 1-21 有
請求の範囲 無

進歩性(IS)

請求の範囲 有
請求の範囲 1-21 無

産業上の利用可能性(IA)

請求の範囲 1-21 有
請求の範囲 無

2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

引用文献1: JP 9-297137 A (株式会社シノテスト)

引用文献2: J. Biochem., (1987) Vol. 101, No. 3, p. 729-741

引用文献3: SCHIELE F. et al. "Feasibility of a recombinant human apolipoprotein E reference material"

Fresenius J. Anal. Chem. 1998, Vol. 360, No. 3/4, p501-504

請求の範囲 1-21

引用文献1には、変性又は修飾リポタンパク質に対する抗体を作製して、変性又は修飾を受けたリポタンパク質を測定することが記載されており、変性又は修飾リポタンパク質を作製する際に、銅イオンによる酸化を行い、酸化による変性または修飾を受けたリポタンパク質を調製したことが記載されている。

引用文献2には、変性リポタンパク質を作製する際に、無水酢酸を用いてアセチル化すること、マロンジアルデヒドを用いてアルデヒド化することが記載されている。

国際調査報告に記載されていなかった引用文献3には、リポタンパク質であるアポEを凍結乾燥したところ安定であったことが記載されている。

ここで、変性リポタンパク質測定用の標準物質に用いられる変性リポタンパク質を安定化させようとすることは自明の課題であり、この際に引用文献3に記載されたように凍結乾燥させることは当業者が容易に想到し得たものと認める。

また、変性のさせ方は引用文献1や2に記載された方法から適宜選択し得たものと認められ、このようにして変性させたりポタンパク質を標準物質として変性リポタンパク質を測定することも当業者が必要に応じて適宜なし得たものと認める。

従って、請求の範囲1乃至21に係る発明は引用文献1乃至3の記載に基づいて当業者が容易になし得たものと認める。

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference F2000-38-PCT	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP00/03413	International filing date (day/month/year) 26 May 2000 (26.05.00)	Priority date (day/month/year) 02 June 1999 (02.06.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C07K 14/775, G01N 33/92 // C07K 16/18		
Applicant VESSEL RESEARCH LABORATORY CO., LTD.		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 3 sheets, including this cover sheet.
- ☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 31 October 2000 (31.10.00)	Date of completion of this report 12 July 2001 (12.07.2001)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/03413

I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the claims:
pages _____, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the drawings:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims. Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/03413

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**1. Statement**

Novelty (N)	Claims	1-21	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-21	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-21	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Document 1: JP, 9-297137, A (Shiriotestu K.K.)

Document 2: J. Biochem., Vol. 101, No. 3, 1987, pp. 729-741

Document 3: Schiele F. et al., "Feasibility of a recombinant human apolipoprotein E reference material, Fresenius J. Anal. Chem., Vol. 360, No. 3/4, 1998, pp. 501-504

Claims 1-21

Document 1 describes the measurement of a denatured or modified lipoprotein by preparing antibodies to the denatured or modified lipoprotein, and it states that in the process of preparing a denatured or modified lipoprotein, oxidation by copper ions is performed to prepare a lipoprotein that is denatured or modified by oxidation.

Document 2 states that in the process of preparing a denatured lipoprotein, acetylation is performed using acetic anhydride, and that an aldehyde is prepared using malondialdehyde.

Document 3, which was not cited in the international search report, states that apo-E, which is a lipoprotein, is stable when it is freeze-dried.

In this field the stabilization of a denatured lipoprotein to be used as a standard substance for the measurement of denatured lipoprotein is a problem that is self evident, and this examination finds that persons skilled in the art could easily conceive of freeze-drying, as described in document 3.

This examination finds that the denatured form can be selected as needed from the processes described in documents 1 and 2, and persons skilled in the art can apply the denatured lipoprotein as needed as a standard substance for the measurement of denatured lipoprotein.

Therefore, this examination finds that persons skilled in the art could easily have prepared the inventions set forth in Claims 1-21 based on the descriptions in documents 1-3.

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2000 年 12 月 14 日 (14.12.2000)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 00/75189 A1

- (51) 国際特許分類: C07K 14/775, 一色字上山地600番1 協和メデックス株式会社 協和メデックス研究所内 Shizuoka (JP).
G01N 33/92 // C07K 16/18
- (21) 国際出願番号: PCT/JP00/03413 (74) 代理人: 八田幹雄, 外(HATTA, Mikio et al.); 〒102-0084 東京都千代田区二番町11番地9 ダイアパレス二番町 Tokyo (JP).
- (22) 国際出願日: 2000 年 5 月 26 日 (26.05.2000)
- (25) 国際出願の言語: 日本語 (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: 特願平11/155198 1999 年 6 月 2 日 (02.06.1999) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社 ベッセルリサーチ・ラボラトリー (VESSEL RESEARCH LABORATORY CO., LTD.) [JP/JP]; 〒194-8533 東京都町田市旭町3丁目6番6号 Tokyo (JP).
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 重松 貴 (SHIGEMATSU, Takashi) [JP/JP]. 島村京子 (SHIMAMURA, Kyoko) [JP/JP]. 木村順治 (KIMURA, Junji) [JP/JP]; 〒194-8533 東京都町田市旭町3丁目6番6号 株式会社ベッセルリサーチ・ラボラトリー内 Tokyo (JP). 河野弘明 (KOHNO, Hiroaki) [JP/JP]. 末重信之 (SUESHIGE, Nobuyuki) [JP/JP]; 〒411-0932 静岡県駿東郡長泉町南
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: STABILIZED DENATURED LIPOPROTEIN AND PROCESS FOR PRODUCING THE SAME

(54) 発明の名称: 安定化変性リポタンパク質およびその製造方法

(57) Abstract: A denatured lipoprotein excellent in long-term storage stability (i.e., scarcely undergoing protein denaturation) which is to be used as a standard in quantitating a denatured protein in blood r assaying physiol gical activity. The process for producing this stabilized denatured lipoprotein comprises artificially denaturing a lipoprotein and freeze-drying the denatured lipoprotein thus obtained; or treating a solution containing a denatured lipoprotein to a process involving at least ne freezing step to thereby denature the lipoprotein contained in the solution and further freeze-drying the denatured lipoprotein thus obtained.

[続葉有]

WO 00/75189 A1



(57) 要約:

長期保存安定性に優れた（すなわち、タンパク質の変性が起こりにくい）血液
中の変性リボタンパク質量の測定や生理活性の測定用の標準物質として使用され
る変性リボタンパク質およびその製造方法を提供する。本発明の安定化変性リボ
タンパク質の製造方法は、リボタンパク質を人工的に変性させ、変性リボタンバ
ク質を得、該変性リボタンパク質を凍結乾燥する；または変性リボタンパク質を
含有する溶液に対し少なくとも一回の凍結を含む工程を加えて該溶液中に含まれ
るリボタンパク質を変性させ、変性リボタンパク質を得、該変性リボタンパク質
をさらに凍結乾燥することからなる。

明 細 書

安定化変性リボタンパク質およびその製造方法

5 技術分野

本発明は、安定化変性リボタンパク質およびその製造方法に関するものである。詳しく述べると、本発明は、リボタンパク質を変性させた変性リボタンパク質を凍結乾燥することによって得られる長期保存安定性に優れた変性リボタンパク質およびその製造方法に関するものである。

- 10 本発明はまた、変性リボタンパク質の製造方法に関するものである。詳しく述べると、本発明は、リボタンパク質を含有する溶液に対し少なくとも一回の凍結を含む工程を加えることにより該リボタンパク質を変性することからなる変性リボタンパク質の製造方法、ならびにこのようにして製造された変性リボタンパク質をさらに凍結乾燥することによって得られる長期保存安定性に優れた変性リボタンパク質およびその製造方法に関するものである。

- 変性リボタンパク質は、心筋梗塞や狭心症などの冠動脈系疾患、脳梗塞や脳血管系痴呆などの脳動脈系疾患、あるいは腎症、糖尿病性腎症などの腎動脈系疾患ならびに末梢動脈閉塞症のような末梢動脈系疾患などの各種循環器系疾患との関わりが強く示唆されており、変性リボタンパク質量の測定用の標準物質ならびに
- 20 変性リボタンパク質の生理的役割や生理活性を調べるための各種実験用の試薬は、結果を左右する非常に重要な物質である。したがって、このようにして安定化された変性リボタンパク質は、例えば、変性リボタンパク質を認識する抗体と接触させ、該抗体の試料に対する反応性を測定することによって血液成分中に含まれる変性リボタンパク質を測定する方法において用いられる標準物質や、変性リボタンパク質の生理的役割や生理活性を調べるための各種実験用の試薬として有用
- 25 である。

背景技術

心筋梗塞や狭心症などの冠動脈系疾患、脳梗塞や脳血管系痴呆などの脳動脈系疾患、あるいは腎症、糖尿病性腎症などの腎動脈系疾患および末梢動脈閉塞症のような末梢動脈系などの各種循環器系疾患においては、血清中の脂質が重要な役割を担っていることは強く示唆されており、血清脂質低下薬、特にコレステロール低下薬には莫大な保健医療費が支払われている。しかしながら、最近の研究によれば、このような患者群と健常者群の比較を行なった場合、血清脂質の絶対量は両群間でそれほど大きな違いはなく、むしろ低密度リポタンパク質（LDL）の変性物である酸化LDLの血清中の存在量が両群間で明確に異なっていることが報告された（例えば、Toshima, S. et al. (1996) *Circulation*, 94, Suppl. I : 1288）。また、変性リポタンパク質の一つである酸化リポタンパク質と粥状硬化病巣の進展との関連性が、スタインバーグ(Steinberg)らにより指摘された（例えば、Steinberg, D., Parthasarathy, S., Carew, T.E., Khoo, J.C., and Witztum, J.L., (1989) *N. Engl. J. Med.*, 320 : 915）。このため、近年、変性リポタンパク質を用いた様々な測定法の開発がなされ（例えば、特開平8-304, 395号公報や特開平9-288, 106号公報）、変性リポタンパク質の生理的役割を調べるための試験の重要性が増してきている。

しかしながら、これらの実験を行なう上で、測定のための標準物質を得ることが困難であることが事情を複雑にしてきた。即ち、変性リポタンパク質の生理的役割を調べる上では、例えば、血清中の変性リポタンパク質を複数の施設から多数集めて比較する必要がある、このためには個々の試験毎の測定値が変動しないことが必須であるが、これらの試験に必要な期間を通じて、安定で再現性のよい標準物質の存在なくしては、測定間の再現性を確保できない。また、異なる標準物質を用いることによって、測定者間の実験結果を著しく変動させることは、その生理的役割に対する解釈を複雑にし、一定の結論を得ることができない。この

ように安定に保存可能な標準物質が得られないことが、その生理的な重要性が指摘されながらも、例えば、変性リボタンパク質の存在量の測定による疾病の正確な判断手段としての応用の道が閉ざされていた。

通常、例えば、血清中のタンパク質量の測定にあたっては、いわゆる標準血清
5 のようなものや、目的とする成分を単離した状態で、これらを何らかの方法で安定化し標準物質とすることが用いられている。リポタンパク質についていえば、例えば、リポタンパク質含有血漿または血清を、必要であれば、シュクロース等の非還元性の糖と混合して、水分含量が1～10質量%の範囲になるまで凍結乾燥することによって長期保存において安定な標準血漿または標準血清を製造する
10 方法（EP-A-617289号公報）、アポリポタンパク質および脂質から得た再構成リポタンパク質をシュクロースやマンニトールなどの安定化剤の存在下で凍結乾燥して安定化させる安定凍結乾燥物の工業的製造方法（US-A-5,652,399号公報）が報告されていた。しかしながら、上記公報では、リポタンパク質を変性させないように安定化する手段としてのリポタンパク質の安定
15 化が図られているのみであり、安定化された変性リポタンパク質およびその製造方法については依然として開示がなされていない。

一方で、従来よく知られた方法により、例えば、超遠心分離法によりリボタンパク質を単離・精製し、これを銅イオン等の金属イオンで酸化させるか、無水酢酸と反応させてアセチル化する、あるいは、マロンジアルデヒド等と反応させるなどの方法で、それぞれ酸化リボタンパク質、アセチル化リボタンパク質およびマロンジアルデヒド化リボタンパク質などの変性リボタンパク質を得る方法が知られている。しかしながら、このような方法で製造した変性リボタンパク質は、未変性のリボタンパク質より不安定であり、そのままの状態では長時間の保存は不可能であった。

25 このような状況を鑑みて、特開平9-288, 106号公報に、リン脂質を人工的に酸化して得られたリン脂質の酸化物を血漿リポタンパク質に組み込んだ物

を標準品として用いて、ヒト酸化リポタンパク質を測定する方法が開示されている。しかしながら、上記方法で開示される標準物質は保存安定性が十分でなく、使用するたび毎に調製する必要があり、操作が煩雑である。

このような諸事情を鑑みると、長期間安定して保存できる変性ポリタンパク質およびその製造方法が強く求められていた。

したがって、本発明は、血液成分中に含まれる変性リポタンパク質量の測定用の標準物質や変性リポタンパク質の生理的役割や生理活性を調べるための各種実験用の試薬として使用される、長期保存安定性に優れた（すなわち、保存期間によって測定値の変動が見られない）変性リポタンパク質およびその製造方法を提供することを目的とするものである。

発明の開示

本発明者らは、上記目的を解決するべく鋭意努力した結果、リポタンパク質を含む卵黄、乳汁、全血、血清や血漿、これらから部分分画されたりリポタンパク質画分、ならびに超遠心分離法等によって分画精製されたりリポタンパク質などのリポタンパク質を銅イオン等の金属イオン等で代表される触媒によって酸化させた酸化リポタンパク質、無水酢酸等によってアセチル化させたアセチル化リポタンパク質あるいはマロンジアルデヒド等でアルデヒド化したマロンジアルデヒド化リポタンパク質等の人工的に変性させた変性リポタンパク質を凍結乾燥することによって、変性リポタンパク質の長期保存安定性を顕著に向上することができ、ゆえに、本発明の目的が解決されることを見い出した。本発明者らはまた、凍結乾燥時にシュクロース、ラクトース、トレハロース、ウシ血清アルブミン（BSA）あるいはヒト血清アルブミン（HSA）等を安定化剤として存在させることによって、変性リポタンパク質の長期保存安定性をさらに向上することができ、これにより上記諸問題をより良く解決できることを見い出した。

本発明者はさらに、上記目的を解決するべく鋭意努力した結果、リポタンパク

質を含む溶液に対し少なくとも一回の凍結を含む工程を加えて当該溶液中に含まれるリポタンパク質を変性させることにより血液中の変性リポタンパク質量の測定用の標準物質や変性リポタンパク質の生理的役割や生理活性を調べるための各種実験用の試薬として使用されうる変性リポタンパク質が得られること、さらに

- 5 このようにして得られた変性リポタンパク質を凍結乾燥することによって、変性リポタンパク質の乾燥状態での長期保存安定性及び該乾燥状態の変性リポタンパク質を溶液に溶解した後の保存安定性を顕著に向上することができ、ゆえに、本発明の目的が解決されることを見い出した。本発明者らはまた、ここでも凍結乾燥時にシュクロース、ラクトース、トレハロース、ウシ血清アルブミン（BSA）あるいはヒト血清アルブミン（HSA）等を安定化剤として存在させること
- 10 によって、変性リポタンパク質の長期保存安定性をさらに向上することができ、これにより上記諸問題をより良く解決できることを見い出した。

上記知見に基づいて、本発明を完成するに至った。

- すなわち、上記目的は、リポタンパク質を人工的に変性させ、変性リポタンパク質を得、該変性リポタンパク質を凍結乾燥することにより該変性リポタンパク質を安定化することからなる安定化変性リポタンパク質の製造方法によって達成される。
- 15

- 上記目的はまた、リポタンパク質を含む溶液に対し少なくとも一回の凍結を含む工程を加えることにより、該溶液中に含まれるリポタンパク質を変性することからなる変性リポタンパク質の製造方法によっても達成される。
- 20

- 上記目的はさらに、リポタンパク質を含む溶液に対し少なくとも一回の凍結を含む工程を加えることにより、該溶液中に含まれるリポタンパク質を変性させ、変性リポタンパク質を得、該変性リポタンパク質をさらに凍結乾燥することにより該変性リポタンパク質を安定化することからなる安定化変性リポタンパク質の製造方法によっても達成される。
- 25

図面の簡単な説明

第1図は、本発明の実施例1において得られた酸化LDL（銅で酸化したLDLを凍結乾燥後、所定の方法で溶解したもの）を試料として作成した検量線を示す図である。

- 5 第2図は、本発明の実施例1において得られた酸化LDL（銅で酸化したLDLを凍結乾燥したもの）を4℃で保存し、一定間隔で所定の方法で溶解したものを試料として測定した場合と、銅で酸化したLDLを凍結乾燥せずそのまま4℃で保存し、一定間隔で試料として測定した場合との測定値の比較を示す図である。

- 10 第3図は、本発明の実施例2において得られた酸化HDL（銅で酸化したHDLを凍結乾燥後、所定の方法で溶解したもの）を試料として作成した検量線を示す図である。

- 15 第4図は、本発明の実施例2において得られた酸化HDL（銅で酸化したHDLを凍結乾燥したもの）を4℃で保存し、一定間隔で所定の方法で溶解したものを試料として測定した場合と、銅で酸化したHDLを凍結乾燥せずそのまま4℃で保存し、一定間隔で試料として測定した場合の測定値との比較を示す図である。

第5図は、本発明の実施例3において得られた酸化リボタンパク質a [Lp (a)]（銅で酸化したLp (a)を凍結乾燥後、所定の方法で溶融したもの）を試料として作成した検量線を示す図である。

- 20 第6図は、本発明の実施例3において得られた酸化Lp (a)（銅で酸化したLp (a)を凍結乾燥したもの）を4℃で保存し、一定間隔で所定の方法で溶解したものを試料として測定した場合と、銅で酸化したLp (a)を凍結乾燥せずそのまま4℃で保存し、一定間隔で試料として測定した場合との測定値の比較を示す図である。

- 25 第7図は、実施例4において、血漿に対して凍結を含む工程を施すことにより、変性リボタンパク質が製造されることを示す図である。

第8図は、実施例5において、実施例5（2）で調製された凍結変性ヒト血清

標準品および実施例 1 (3) で調製された酸化 LDL 標準品に関する、ELISA 法による、溶解後保存安定性を評価した時の測定値 (吸光度) の比較を示す図である。

第 9 図は、実施例 6 において、ヒト LDL に凍結を含む工程を施すことにより、
5 変性リポタンパク質が製造されることを示す図である。

第 10 図は、実施例 6 において、実施例 6 (2) で調製された凍結変性 LDL 標準品および実施例 1 (3) で調製された酸化 LDL 標準品に関する、ELISA 法による、溶解後保存安定性を評価した時の測定値 (吸光度) の比較を示す図である。

10

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明の第一の態様によると、リポタンパク質を人工的に変性させ、変性リポタンパク質を得、この変性リポタンパク質を凍結乾燥することにより変性リポタン
15 ンパク質を安定化することからなる安定化変性リポタンパク質の製造方法が提供される。

本明細書において、「変性リポタンパク質」ということばは、酸化リポタンパク質、アセチル化リポタンパク質及びマロンジアルデヒド等の作用によるアルデヒド化リポタンパク質などの化学変化を受けた変性リポタンパク質、ならびに凝
20 集や 3 次元構造の変化といった構造的変化を受けた変性リポタンパク質双方を意味し、未変性リポタンパク質と比較して荷電の変化、分子量の変化、生体内リセプターへの親和性の変化、FOH1a/DLH3 (受託番号: FERM BP-7171) により産生される抗体 (J. Biol. Chem. 1994. 269: 15274-15279; 及び特開平 7-238, 098 号公報) を代表とする変性リポタンパク質特異的抗体
25 との結合性の変化などによって確認される場合も含む。この際、上記 FOH1a/DLH3 により産生される抗体を代表とする変性リポタンパク質特異的抗体

- との結合性の変化とは、例えば、未変性リポタンパク質と本発明に係る変性リポタンパク質とを抗原として不溶化固相に固相化し、当該抗体を反応させて、固相化抗原に結合した当該抗体量を当該抗体に特性を有する酵素標識化抗体を用いて酵素量として検出する場合における、未変性リポタンパク質抗原から得られるシグナル量と変性したリポタンパク質抗原から得られるシグナル量との相違を示す。

- 本発明において使用されるリポタンパク質は、いずれの生物由来のものであってもよく、例えば、ヒト、ウシ、ウマ、ヤギ、ヒツジ、ウサギ、イヌ、及びギニアビッグなどの哺乳類；ニワトリやウズラなどの鳥類；サケやニシンなどの魚類；ならびに細菌や真菌などの微生物に由来するリポタンパク質が挙げられる。
- さらに、本発明において使用されるリポタンパク質の具体例としては、上記した源由来の、細胞膜、ミトコンドリア膜、ミエリン構造膜や細菌細胞膜等の生体膜などに存在する構造リポタンパク質；血漿、卵黄や乳汁などに存在する可溶性リポタンパク質；ならびに、これらを超遠心分離法によって、カイロミクロン、超低密度リポタンパク質（VLDL）、低密度リポタンパク質（LDL）、リポタンパク質X、中間密度リポタンパク質（IDL）、リポタンパク質a [Lp (a)]、HDL 2及びHDL 3等の高密度リポタンパク質（HDL）、及び超高密度リポタンパク質（VHDL）に分画されたりポタンパク質画分などが挙げられる。これらのリポタンパク質は、単独で使用されてもあるいは2種以上の混合物の形態であってもよい。これらのうち、ヒト由来のリポタンパク質であることが好ましく、ヒト血漿及び血清由来のカイロミクロン、VLDL、LDL、Lp (a)、HDL 2若しくはHDL 3、またはこれらの混合物がより好ましく、最も好ましくはヒト血漿及び血清由来のLDLが使用される。

- 本発明で代表として使用されるヒトリポタンパク質は、ヒト血清から遠心沈降法や超遠心分離法等の公知の方法を用いて所定の比重を有する画分を得、この画分を透析や脱塩等の既知の方法により精製することによって調製される。例えば、低密度リポタンパク質（LDL）を調製する方法としては、以下の（1）～

(3)の方法が挙げられる。

(1) 正常ヒト血清20~30 mLに、エチレンジアミン四酢酸ナトリウム (EDTA-2Na)を加え、最終濃度を1 mmol/Lとする。これに、NaBrを加え、比重1.000に合わせる。遠心チューブに分注し、その上にNaBrで、比重1.15、1.063、1.019及び1.006に合わせた緩衝液を順に重層し、これを4℃で24時間遠心(120,000×g)する。上端から順に分画し、各画分の比重を屈折計で測定し、比重1.019~1.063の画分をLDL画分として採取する。このようにして得られたLDL分画を、採取後直ちに、0.25 mmol/L EDTAを含むPBS [10 mmol/Lのリン酸緩衝液、140 mmol/L NaCl (pH 7.4)]で透析する(特開平7-238,098号公報、段落番号0040)；

(2) ヘパリン採血で得られたヒト血漿に最終濃度で0.25 mmol/LとなるようにEDTAを加えて、その0.75 mLずつを超遠心分離用試験管(1~4 mL容)に採り、0.3 mmol/L EDTAを含む0.15 mol/L NaClを250 μL重層して185,000×gにて10℃で2.5時間遠心する。上層150 μLを捨て、下層750 μLを分取して、KBr溶液(50 w/v%) 150 μLを加えて、比重1.063とする。超遠心分離用試験管(1~4 mL容)の底に比重調整した血漿を移して244,000×gにて10℃で16時間遠心する。上層の橙色バンド(約100~150 μL)を注意深く回収し、0.25 mmol/L EDTAを含むPBSに対して4℃、6時間(3リットルを2時間間隔で2回交換)透析する(特開平8-304,395号公報、段落番号0050)；または

(3) EDTAを抗凝固剤として得たヒト血漿から超遠心分離法にて比重1.019~1.063の部分 LDL画分として回収する。アガロース電気泳動法にて単一の鋭いバンドを得られることによりLDLの純度を確認した後、0.25 mmol/L EDTAを含むPBS溶液(pH 7.4)に対して十分に透析す

る（特開平9-288, 106号公報、段落番号0062）。

また、例えば、リボタンパク質a [Lp(a)] を調製する方法の一例としては以下がある：ヘパリン採血で得たヒト血漿に最終濃度で0.25 mmol/LとなるようにEDTAを加え、0.3 mmol/L EDTAを含む0.15 mol/L NaCl 250 μ Lを重層して105,000 \times gにて8°Cで20時間遠心する。上層を捨て、下層に予め乳鉢で粉末化したKBrを加えて、4°Cにて泡立てないようにして溶解し、比重を1.125に調整し、105,000 \times gにて8°Cで20時間遠心する。上層の橙色バンドを注意深く回収し、バイオゲルA-5m（バイオラッド社製）を用いて1 mol/L NaCl, 2 mmol/L EDTA, 10 mmol/L リン酸緩衝液を展開溶媒として、ゲル濾過する。得られた各フラクションをLp(a) 測定キット（テルモ株式会社製）により測定し、Lp(a) 画分を回収する。この画分をリジンセファロース4B（ファルマシア製）にかけ、吸着画分を0.2 mol/L ϵ -アミノカプロン酸を含む緩衝液により溶出させ、0.25 mmol/L EDTAを含むPBSに対して透析する（特開平8-304, 395公報、段落番号0052）。

本発明において、リボタンパク質を人工的に変性する方法は、特に制限されるものではなく公知の方法が使用される。例えば、ヒトリボタンパク質を用いた場合の変性方法としては、以下の方法が挙げられる：ヒトリボタンパク質を金属イオンの存在下で酸化する方法；ヒトリボタンパク質をアセチル化する方法；ヒトリボタンパク質をマロンジアルデヒドを用いてアルデヒド化する方法；およびリン脂質を人工的に酸化して得られる化合物（例えば、1-パルミトイル-2-(9-オキソノナノイル)-グルセロール-3-ホスホコリン及び1-パルミトイル-2-(5-オキソバレロイル)-グルセロール-3-ホスホコリン）を適当な溶媒（例えば、DMSO）に溶解した溶液を、ヒトリボタンパク質に添加する方法が挙げられる。これらのうち、ヒトリボタンパク質を金属イオンの存在下で酸化する方法；ヒトリボタンパク質をアセチル化する方法；及びヒトリボタンパク質を

1 1

マロンジアルデヒドを用いてアルデヒド化する方法が好ましく使用される。

ここで、上記好ましい3方法について代表対象として以下に詳述する。

第一に、ヒトリポタンパク質を金属イオンの存在下で酸化する実施態様について以下に詳述する。上記実施態様の一例を以下に記載する：上記したようにして

5 調製されたヒトリポタンパク質（画分）をEDTAを含まない緩衝液〔例えば、PBS（pH7.4）〕で透析することなどによりEDTAを除去し、所定のタンパク質濃度（50～2000 μ g/mL、好ましくは100～500 μ g/mL）に調整した後、硫酸銅（CuSO₄）を所定濃度になるように添加し、約36～38℃で、反応させる。

10 上記実施態様で使用される金属イオンとしては、フッ化銅（II）二水和物、臭化銅（II）、酸化銅（II）、水酸化銅（II）、硫酸銅（II）、硫酸銅（II）五水和物、セレン化銅（I）、セレン化銅（II）、セレン酸銅（II）五水和物、ヘキサフルオロケイ酸銅（II）四水和物、酢酸銅（II）一水和物、テトラアンミン銅（II）硫酸塩一水和物、及びビス（エチレンジアミ
15 ン）銅（II）硫酸塩二水和物由来の銅イオン；塩化鉄（II）、臭化鉄（II）六水和物、硝酸鉄（II）六水和物、チオシアン酸鉄（II）三水和物、酢酸鉄（II）四水和物、シュウ酸鉄（III）五水和物、硫酸アンモニウム鉄（II）六水和物、硫酸カリウム鉄（III）十二水和物、硫酸アンモニウム鉄（II）十二水和物、及び硫酸鉄由来の鉄イオン；ヘモグロビン（Hb）、トランスフェリン（Tf）及びラクトフェリン（Lf）の金属イオンならびにこれらの混合物が挙げられ、これらのうち、硫酸銅（II）、硫酸銅（II）五水和物由来の銅イオンまたはこれらの混合物が好ましく使用される。なお、これらの金属イオンは、単独で使用されてもあるいは2種以上の混合物の形態で使用されてもよい。

25 また、上記実施態様において、金属イオンの使用量は、ヒトリポタンパク質を十分酸化できる量であれば特に制限されないが、例えば、金属イオンの濃度が、

酸化されるヒトリポタンパク質 1 g に対して、10~200 $\mu\text{mol/L}$ 、好ましくは 25~100 $\mu\text{mol/L}$ となるような量である。

また、上記実施態様において、反応時間が短すぎる場合には、リポタンパク質の変性（酸化）が十分起こらず、一方、反応時間が長すぎる場合には、リポタンパク質自体の過剰な分解が引き起こされ、例えば、アポタンパク質の抗原性などが失われてしまうことから好ましくない。また、反応時間は、残存するEDTA量や溶液全体の量などにより変動するので一概には規定できないが、上記実施態様において調製されるリポタンパク質（画分）の場合では、約36～38℃で、1～24時間、好ましくは2～4時間である。

10 第二に、ヒトリポタンパク質をアセチル化する実施態様について以下に詳述する。上記実施態様の一例を以下に記載する：所定タンパク質濃度（約500～2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、好ましくは500～1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）の上記したようにして調製されたヒトリポタンパク質（画分）の溶液に飽和酢酸ナトリウムを等容加え、0～4℃で1～2時間、攪拌する。次に、無水酢酸を0.25～4 μL

15 （即ち、ヒトリポタンパク質に対して、0.5～2 $\mu\text{L}/\text{mg}$ ）、好ましくは0.4～2.4 μL （即ち、ヒトリポタンパク質に対して、0.8～1.2 $\mu\text{L}/\text{mg}$ ）加えて、0～4℃で60～120分間、攪拌した後、0.25 mmol/L EDTAを含むPBS（pH7.4）に対して2～8℃で十分（500～1000倍容で2～3回（2時間以上／回））透析する。

20 第三に、ヒトリポタンパク質をマロンジアルデヒドを用いてアルデヒド化する実施態様について以下に詳述する。上記実施態様の一例を以下に記載する：0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH 6.5) における、所定タンパク質濃度 (約0.25~1 mg/mL、好ましくは0.25~0.5 mg/mL) の上記したようにして調製されたヒトリポタンパク質 (画分) 溶液に、マロンジアルデヒド溶液

25 (マロンジアルデヒドビスジメチルアセタール1 mol/Lを0.1 mol/L塩酸存在下に100℃で5分加熱し加水分解したもの) を0.625~10 μ L

13

(即ち、ヒトリポタンパク質に対して、2. 5~10 $\mu\text{L}/\text{mg}$)、好ましくは1~6 μL (即ち、ヒトリポタンパク質に対して、4~6 $\mu\text{L}/\text{mg}$) 加え、30~40°Cで2~4時間、反応させた後、この反応液を0.25 mmol/L EDTAを含むPBS (pH 7.4) に対して2~8°Cで十分(500~1000

5 倍容で2~3回(2時間以上/回)) 透析する。

本発明の方法は、このようにして得られた変性リポタンパク質を安定化を目的として凍結乾燥する工程を含むことを必須とする。本明細書において、「凍結乾燥」ということばは、当該分野において使用されるのと同様の意味で使用され、すなわち、試料を凍結させ、凍結状態のままで減圧して、試料から水や昇華性のものを除き、乾燥することを意味する。本発明において、凍結乾燥の条件は、変性リポタンパク質を安定化できる条件であれば特に制限されるものではないが、通常、-80~20°C、好ましくは-80~15°Cの温度で、0.667~13.33 Pa、好ましくは0.667~1.333 Paの圧力で、12~72時間、好ましくは24~72時間、凍結乾燥する。このような凍結乾燥工程によって、

10 変性リポタンパク質を含む凍結乾燥物中の水分含量は、通常、10質量%以下、好ましくは1質量%以下である。

本発明において、凍結乾燥工程中に安定化剤を存在させることが好ましい。上記態様において使用される安定化剤としては、当該分野において通常使用される安定化剤が使用されるが、具体的には、シュクロース、ラクトース、トレハロース等の糖類；ウシ血清アルブミン(BSA)、ヒト血清アルブミン(HSA)等のタンパク質などが挙げられる。これらのうち、シュクロース、ラクトース、トレハロース、ウシ血清アルブミン(BSA)及びヒト血清アルブミン(HSA)が安定化剤として好ましく使用される。なお、上記された安定化剤は、単独で使用されてもあるいは2種以上の混合物の形態で使用されてもよい。また、この際

20 25 の安定化剤の使用量は、変性リポタンパク質の安定化が図れる量であれば特に制限されるものではないが、通常、1~20質量%、好ましくは2~5質量%であ

る。

また、本発明において、凍結乾燥工程中に安定化剤を存在させる場合の安定化剤の添加時期は、特に制限されるものではないが、凍結乾燥前に予め安定化剤を添加することが好ましく、特に変性工程と凍結乾燥工程との間に安定化剤を添加
5 することが特に好ましい。さらに、凍結乾燥後、安定化剤を取り除く工程は特に必要なく、変性リボタンパク質の保存安定性を考慮すると、むしろ凍結乾燥状態を保つ間は安定化剤を存在させることが好ましい。

本発明の第二の態様によると、リボタンパク質を含む溶液に対し少なくとも一回の凍結を含む工程を加えて当該溶液中に含まれるリボタンパク質を変性させる
10 ことからなる変性リボタンパク質の製造方法が提供される。また、本発明の第三の態様によると、このようにして得られた変性リボタンパク質をさらに凍結乾燥することにより当該変性リボタンパク質を安定化することからなる安定化変性リボタンパク質の製造方法が提供される。本発明者らは、リボタンパク質を含む溶液に少なくとも一回の凍結を含む工程を加えて当該溶液中に含まれるリボタンバ
15 ク質を変性させることによって得られる変性リボタンパク質もまた、血液中の変性リボタンパク質量の測定に用いる標準物質や変性リボタンパク質の生理的役割や生理活性を調べるための試薬として使用されうること；およびこのようにして得られた変性リボタンパク質をさらに凍結乾燥することによって変性リボタンバ
20 ク質は乾燥状態での長期保存安定性及び該乾燥状態の変性リボタンパク質を溶液に溶解した後の保存安定性に優れることを発見し、この知見に基づいて上記態様の方法を知得した。

第二または第三の態様に係る方法は、リボタンパク質を含む溶液を凍結する工程を含むことを必須要件とする。第二または第三の態様において、「リボタンバ
ク質」ということばは、上記第一の態様における定義と同様である。リボタンバ
25 ク質を含む溶液としては、例えば、血清、血漿、ならびにカイロミクロン、超低密度リボタンパク質（VLDL）、低密度リボタンパク質（LDL）、リボタン

パク質X、中間密度リポタンパク質 (IDL)、リポタンパク質a [Lp (a)]、HDL 2 及びHDL 3等の高密度リポタンパク質 (HDL) 及び超高密度リポタンパク質 (VHDL) 等のリポタンパク質画分などが挙げられる。これらのうち、血清、血漿、カイロミクロン、VLDL、LDL、Lp (a)、HDL 2 若しくはHDL 3、またはこれらの混合物がリポタンパク質を含む溶液としてより好ましく、最も好ましくは、ヒト血漿、ヒト血清、ならびにヒト血漿及び血清由来のLDLが使用される。

第二の態様の方法は、リポタンパク質を含む溶液に対して凍結を含む工程を施すことを必須とする。本明細書において、「凍結を含む工程」ということは、

当該溶液中に含まれるリポタンパク質内のまたは該リポタンパク質を実質的に取り囲む環境中の水分の一部または全部を凍結する工程を少なくとも一回含む工程を意味し、本発明に係る凍結を含む工程を行なうことによって得られる変性リポタンパク質としては、上記第一の態様において記載した変性リポタンパク質のいずれかが挙げられる。好ましくは、本発明に係る凍結を含む工程を行なうこと

によって得られた変性リポタンパク質は、酸化リポタンパク質、アルデヒド化リポタンパク質、またはハイブリドーマセルラインFOH1a/DLH3 (受託番号: FERM BP-7171) により産生される抗体 (本明細書中では、単に「DLH3抗体」とも称する) と反応するリポタンパク質である。なお、上記方法で使用されるハイブリドーマセルラインFOH1a/DLH3は、1994年

2月17日に、日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号に所在する通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号 FERM P-14153として「Mouse-Mouse hybridoma FOH1a/DLH3」の表示で寄託され、該寄託は、2000年5月26日にブタベスト条約に基づく寄託に切り換えられ、受託番号 FERM BP-7171として同所に保管されている。

上記態様において、リポタンパク質を含む溶液に対して変性を目的として施される凍結を含む工程の条件は、この溶液中に含まれるリポタンパク質を変性でき

る条件であれば特に制限されるものではなく、また、凍結を含む工程においては、凍結を行なう際のリポタンパク質を実質的に取り囲む環境によってその凍結の効果は大きく左右されるために一概には限定できないが、例えば、凍結を含む工程中の凍結の条件は、 $0.01 \sim 10^{\circ}\text{C}/\text{分}$ 、好ましくは $0.01 \sim 1^{\circ}\text{C}/\text{分}$ の降温速度で、 $0 \sim -196^{\circ}\text{C}$ 、好ましくは $-5 \sim -85^{\circ}\text{C}$ の温度になるまで降温して凍結し、 $0 \sim 36$ 時間、好ましくは $0 \sim 16$ 時間、所定の温度を維持するような条件である。また、第二の態様において、リポタンパク質の変性のための凍結を含む工程は、少なくとも一回行なう必要があり、また、繰り返し行なっても特に構わない。繰り返し行なわれる場合の凍結を含む工程数は、 $1 \sim 10$ 回、より好ましくは $1 \sim 4$ 回であることが好ましい。本発明において、繰り返す工程内容は凍結を含む工程毎に異なってもよく、また、各工程の凍結条件は同一であつてもあるいは異なるものであつてもよい。この際、凍結乾燥工程数が 10 回を超えると、これに見合うリポタンパク質の変性効果が減弱し、経済的でない。

または、上記第二の態様によるリポタンパク質の変性のための凍結を含む工程は、凍結後に融解を含む工程であつてもよい。上記第二の態様において凍結を含む工程内に融解を含む場合、その条件は特に制限されるものではないが、融解は、 $0.01 \sim 10^{\circ}\text{C}/\text{分}$ 、好ましくは $0.1 \sim 10^{\circ}\text{C}/\text{分}$ の昇温速度で、 $0 \sim 42^{\circ}\text{C}$ 、好ましくは $0 \sim 37^{\circ}\text{C}$ の温度になるまで昇温することによって行なわれる。

または、上記第二の態様によるリポタンパク質の変性のための凍結を含む工程は、該工程内に乾燥を含む工程であつてもよい。この際の凍結後の乾燥を含む工程の条件は、特に制限されるものではないが、乾燥は、例えば、 $-80 \sim 20^{\circ}\text{C}$ 、好ましくは $-80 \sim 15^{\circ}\text{C}$ の温度で、 $0.6 \sim 13 \text{ Pa}$ 、好ましくは $0.6 \sim 1.3 \text{ Pa}$ の圧力で、 $12 \sim 72$ 時間、好ましくは $24 \sim 72$ 時間、乾燥することによって行なわれる。

または、上記第二の態様によるリポタンパク質の変性のための凍結を含む工程は、リポタンパク質を含む溶液を凍結乾燥し、得られた乾燥物を溶媒に溶解した

後、当該溶液を再度凍結乾燥することからなる工程であってもよい。この際の凍結乾燥工程は第一の態様における定義と同様である。また、最初の凍結乾燥で得られた乾燥物を溶解する溶媒は、乾燥物を溶解できるものであれば特に制限されないが、例えば、水、脱イオン水及び蒸留水などが挙げられる。

- 5 第三の態様の方法は、上記第二の態様の方法によって得られた変性リボタンパク質をさらに凍結乾燥して、該変性リボタンパク質を安定化させることを必須要件とするものである。上記態様による凍結乾燥工程は、安定化剤の添加時期以外については第一の態様における定義と同様である。すなわち、第三の態様において、安定化剤は、第二の態様における凍結を含む工程内容によって異なるが、例えば、変性リボタンパク質を含有する溶液に凍結を含む工程を施す際には、安定化剤は、凍結を含む工程前に予め添加しておいても、または変性を目的とする凍結を含む工程と安定化を目的とする凍結乾燥工程との間に添加してもよい。また、変性リボタンパク質を含有する溶液を凍結する際には、安定化剤は凍結を含む工程前に予め添加されることが好ましい。

- 15 本発明の第四の態様によると、上記第一または第三の態様によって製造される安定化変性リボタンパク質が提供される。

このようにして製造された変性リボタンパク質および安定化変性リボタンパク質は長期間保存安定性に優れているので、例えば、変性リボタンパク質を認識する抗体と接触させ、該抗体の試料に対する反応性を測定することによって血液成分中に含まれる変性リボタンパク質を測定する方法において用いられる標準物質や、変性リボタンパク質の生理的役割や生理活性を調べるための各種実験用の試薬として有用である。

- したがって、本発明の第五の態様によると、上記第一または第三の態様によって製造される安定化変性リボタンパク質を標準物質として使用する変性リボタンパク質の測定方法が提供される。また、本発明の第六の態様によると、上記第一または第三の態様によって製造される安定化変性リボタンパク質を標準物質とし

て含有する変性リボタンパク質の測定用の試薬キットが提供される。

上記第五の態様において、変性リボタンパク質の測定方法は特に制限されるものではなく、公知のものが使用できるが、具体的には、変性リボタンパク質を認識する抗体と接触させて、該抗体の試料に対する反応性を測定することにより血液成分中に含まれる変性リボタンパク質を免疫学的に測定する方法、例えば、ラジオイムノアッセイ（RIA）、エンザイムイムノアッセイ（ELISA）、蛍光イムノアッセイ（FIA）、発光イムノアッセイ、凝集イムノアッセイ、免疫比濁法及び免疫比濁法などが挙げられる。また、測定様式としては、競合法およびサンドイッチ法などが挙げられる。これらの方法のうち、本発明による安定化変性リボタンパク質は、免疫学的に測定する方法、特にラジオイムノアッセイ、エンザイムイムノアッセイ、蛍光イムノアッセイ及び発光イムノアッセイにおいて標準物質として好ましく使用される。

また、上記第六の態様において、変性リボタンパク質の測定用の試薬キットは、本発明による安定化変性リボタンパク質を標準物質として含有するものであれば特に制限されるものではなく、本発明による安定化変性リボタンパク質を標準物質として使用する以外は、公知のキットの構成と同様の構成からなる。例えば、本発明による安定化変性リボタンパク質をELISA法における標準物質として使用する場合には、本試薬キットは、検体希釈液、抗体固相化固相、反应用緩衝液、洗浄液、標識化2次抗体（好ましくは、酵素標識化2次抗体）、検出用試薬（例えば、発色液）、および標準物質としての本発明に係る安定化変性リボタンパク質の全部または一部を含む構成よりなる。上記態様もまた本発明の概念に含まれるものである。したがって、第七の態様によると、検体希釈液、抗体固相化固相、反应用緩衝液、洗浄液、標識化2次抗体、検出用試薬、および標準物質としての上記第一または第三の態様によって製造される安定化変性リボタンパク質の全部または一部を構成要素として含む変性リボタンパク質の測定用の試薬キットが提供される。

上記第七の態様において、標準物質が試薬キットに含まれない場合であっても、実質的にキットに使用することを前提に存在する場合には、本発明に係る標準物質は試薬キットの構成要素として認知されるべきである。

次に、ELISA法による変性リポタンパク質の活性測定法を例にとり、下記実施例を参照しながら、本発明による変性リポタンパク質の製造方法およびその効果についてより詳細に説明するが、本発明の態様が下記実施例に限定されるべきものでないことはいうまでもない。

実施例1

(1) LDLの調製

EDTAを抗凝固剤として得たヒト血漿から超遠心分離法（10℃で比重1.019に調整、120,000×g、20時間後、上層を回収し、1.063に比重調整し、さらに120,000×g、24時間）にて比重1.019～1.063の部分、LDL画分として回収した。この際、LDLの純度は、アガロース電気泳動法にて単一の鋭いバンドが得られることにより確認した。

次に、このLDL画分を、0.25mmol/L EDTAを含むPBS（pH 7.4）で十分（16時間または一晩）透析することによって精製した。さらに、このようにして精製されたLDLを、LDLタンパク質濃度が1mg/mLとなるように0.25mmol/L EDTAを含むPBS（pH 7.4）に溶解し、使用するまで4℃で保存した。なお、本実施例において、タンパク質量は、Lowry modified Methodを使用した。簡潔にいうと、2（w/v）%炭酸ナトリウム、0.4（w/v）%水酸化ナトリウム、0.16（w/v）%酒石酸、1（w/v）%SDS溶液及び4（w/v）%硫酸銅溶液を100対1に混合した試薬1.5mLを、それぞれ、サンプル及び標準物質（BSA）0.5mLに混合した。室温にて20分間反応後、フェノール試薬0.15mLを添加し、直ちに混合した。室温にて45分間反応後、660nmにおける吸光度を測定した。

(2) LDLの酸化

20

(1) で調製された LDL を、500～1000 倍容以上の EDTA を含まない PBS (pH 7.4) に対して 3 回以上 (2 時間以上/回) 透析することによって EDTA を除去し、LDL の濃度が $200 \mu\text{g}/\text{mL}$ となるように EDTA を含まない PBS (pH 7.4) に溶かした。次に、この LDL 溶液 10 mL に、
5 硫酸銅 (CuSO_4) を終濃度が $5 \mu\text{mol}/\text{L}$ となるように添加し、 37°C で 3 時間インキュベートすることにより、LDL を酸化した。さらに、この溶液に、EDTA を終濃度が $1 \text{mmol}/\text{L}$ となるように添加することにより、酸化反応を停止した後、500～1000 倍容以上の EDTA を $1 \text{mmol}/\text{L}$ 含む PBS
10 (pH 7.4) に対して 3 回以上 (2 時間以上/回) 透析することにより、 CuSO_4 を除去し、酸化 LDL を調製し、これを 4°C で保存した。

なお、本実施例において、酸化 LDL 量の表現は、原料である LDL のタンパク質量で定義した。

(3) 酸化 LDL の凍結乾燥品の調製

(2) で調製された酸化 LDL を、タンパク質濃度が $6.25 \text{ng}/\text{mL}$
15 (「L タイプ」と称する) 及び $12.5 \text{ng}/\text{mL}$ (「H タイプ」と称する) になるように PBS (pH 7.4) で希釈した後、さらに BSA を終濃度 2 (w/v) % に、及びシュクロースを終濃度 5 (w/v) % になるようにそれぞれ添加して、よく混和した。次に、この混合液をガラス瓶に 1 mL ずつ分注し、共和真空凍結乾燥装置 RL-201BS (共和真空技術株式会社製) を用いて、
20 -50°C で 16 時間凍結した後、 20°C で、 1.33Pa の減圧下で 48 時間凍結乾燥することによって、水分を気化・除去した後、密栓し、 4°C で保存した。なお、この際、凍結乾燥品中の水分含量は 0.8 質量% であった。

(4) 酸化 LDL の凍結乾燥品を標準品として用いた検量線の作成

a. ヘルオキシダーゼ標識抗体の作製

25 精製抗ヒトアポ B 抗体 (ヤギ、ケミコン社製) 溶液 ($5 \text{mg}/\text{mL}$ 、 $0.1 \text{mol}/\text{L}$ ホウ酸緩衝液 pH 8.0) 1 mL に、 $50 \mu\text{L}$ の 2-イミノチオラ

21

ン-HCl溶液 (60 mmol/L、0.1 mol/L ホウ酸緩衝液 pH 8.0) を加え、30°Cで30分間反応させた後、反応溶液を、5 mmol/LのEDTAを含む0.1 mol/Lのリン酸緩衝液 (pH 6.0) で平衡化したセファデックスG-25カラム (1 cm×30 cm) (ファルマシア社製) にかけて、
5 溶出された抗体画分を回収した。西洋ワサビペルオキシダーゼ (「HRP」と略す。東洋紡社製) 溶液 (10 mg/mL、0.1 mol/L リン酸緩衝液 pH 7.0) 1 mLに50 µlのEMCS溶液 (同人化学社製、50 mmol/L DMSO溶液) を加え、30°Cで30分間反応させた後、反応溶液を0.1 mol/Lのリン酸緩衝液 (pH 6.5) で平衡化したセファデックスG-25カラム (1 cm×30 cm) (ファルマシア社製) にかけて、溶出されたHRP画分
10 を回収した。このようにして回収された抗体画分及びHRP画分を混合し、30°Cで30分間反応させた後、反応溶液を0.1 mol/Lのリン酸緩衝液 (pH 7.0) で平衡化したセファデックスG-200カラム (1 cm×100 cm) (ファルマシア社製) にかけて、溶出された抗体-HRPコンジュゲート画分
15 を混合・回収し、これをペルオキシダーゼ標識抗ヒトアポB抗体とした。回収された画分は、直ちに終濃度が1 (w/v) %になるようにBSAを添加し、使用するまで-50°Cで保存した。

b. DLH3抗体の調製

8週齢以上のオスのBalb/cマウスの腹腔内に、0.5 mL/匹のプリスタン (2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン) を注入し、2週間飼育
20 した。次に、このマウスに、所望のモノクローナル抗体を産生する細胞である、ハイブリドーマセルラインFOH1a/DLH3 (受託番号: FERM BP-7171; J. Biol. Chem. 1994. 269: 15274-15279; 及び特開平7-238, 098号公報) を 1×10^6 /匹、腹腔内接種した。7~14日後、マウスの腹腔内
25 に十分腹水が貯溜した時点で、腹腔から18 Gの注射針を用いて腹水を回収し、3000 rpmで10分間遠心分離して、上清を回収した。この上清に、等量の

2 2

PBS (pH 7.4) を加えた後、この混合液と等量の飽和硫酸アンモニウム液を、十分攪拌しながら、1時間かけて滴下し、さらに1時間攪拌を継続した後、3000 rpmで10分間遠心分離して、上清を廃棄し、沈殿物を回収した。さらに、この沈殿物を0.5モル/LのNaClを含むPBS (pH 7.4) を加えて溶解し、この溶液を、0.5モル/LのNaClを含むPBS (pH 7.4) で平衡化した Sephacryl S-300 カラム (2.5 cm × 100 cm) (ファルマシア社製) にかけて、IgM画分を回収し、これをDLH3抗体とした。なお、DLH3抗体の濃度は、光路長1 cmの280 nmにおける吸光度を測定し、得られた吸光度を1.3で除して、この値を抗体濃度 (mg/mL) とした。

10 c. サンドイッチELISA分析

(3) で調製された酸化LDLの凍結乾燥品に精製水1 mLを加えて溶解後、所定濃度 (0 ng/mL、3.125 ng/mL、6.25 ng/mL、12.5 ng/mL、及び25 ng/mL) となるように、1 (w/v) % BSAを含むPBSで希釈した。

15 96F マイクロプレート (ヌンク社製) の各ウェルに、上記b. で調製されたDLH3抗体をTris-HCl (pH 8.0) で10 μg/mLに希釈したものを、1 μg/ウェルとなるように加えて、4°Cで16時間インキュベートした。抗体溶液を捨て、1 (w/v) % BSAを含むTris-HCl (pH 8.0) 350 μLを加えて室温で2時間インキュベートすることによりブロッキングした後、0.05 (v/v) % Tween 20を含むPBS (pH 7.4) で
20 4回洗浄した。

次に、上記で調製された所定濃度の酸化LDL凍結乾燥品を含む希釈液を、それぞれ、100 μLずつウェルに分注し、室温で2時間インキュベートした後、0.05 (v/v) % Tween 20を含むPBS (pH 7.4) で4回洗浄した。
25

さらに、各ウェルに、上記a. で調製されたベルオキシダーゼ標識抗ヒトアポ

23

B抗体を1 (w/v) % BSAを含むPBS (pH 7.4) で1000倍に希釈した溶液100 μ Lを加えて、室温で30分間インキュベートした。次に、0.05 (v/v) % Tween 20を含むPBS (pH 7.4) で4回洗浄した後、
5 オーフエニレンジアミン (和光純薬工業社製) 3 mg/mLを含む0.03 (w/v) % 過酸化水素水100 μ Lを加えて30分間発色させた後、1 mol/L 硫酸50 μ Lを加えて反応を停止させ、492 nmの吸光度を測定した。その結果を第1図に示す。第1図に示されるように、本発明の酸化LDLの凍結乾燥品を用いてきれいな検量線が作成できた。

(5) 保存安定性の比較

10 (3) で調製された酸化LDLの凍結乾燥品 [酸化LDL標準品 (1) (Hタイプ) : 12.5 ng ; 及び酸化LDL標準品 (2) : 6.25 ng (Lタイプ)] を、所定期間 (0、1、3、4週間) 4°Cで保存した。また、(2) で調製された酸化LDLを、タンパク質濃度が6.25 ng/mL (「Lタイプ」と称する) 及び12.5 ng/mL (「Hタイプ」と称する) になるようにPBS
15 (pH 7.4) で希釈した後、さらにBSAを終濃度2 (w/v) %に、及びシクロロスを終濃度5 (w/v) %になるようにそれぞれ添加して、よく混和した。この混合溶液を凍結乾燥せずにそのまま4°Cで冷蔵保存したもの [それぞれ、酸化LDL比較品 (1) (Hタイプ) : 12.5 ng/mL ; 及び酸化LDL比較品 (2) : 6.25 ng/mL (Lタイプ) とする] を、所定期間 (0、1、
20 3、4週間) 4°Cで保存した。

所定期間保存した後、酸化LDL標準品 (1) 及び (2) に精製水1 mLを加え溶解したものならびに酸化LDL比較品 (1) 及び (2) について、それぞれ、上記 (4) c. と同様の操作を行ない、492 nmの吸光度を測定した。その結果を第2図に示す。

25 第2図から示されるように、本発明による凍結乾燥された酸化LDL標準品 (1) 及び (2) では、調製直後 (0週) に比較して測定値がほとんど変動しな

いのに対して、冷蔵保存された酸化LDL比較品（１）及び（２）では、調製直後（０週）に比較して４週間経過後の測定値が、それぞれ、約５０％及び約４５％低下しており、発明による酸化LDL標準品（１）及び（２）に比して保存安定性がかなり劣ることが分かる。

5 実施例 2

（１）HDLの調製

EDTAを抗凝固剤として得たヒト血漿からLDLを除去した後、１．２１に比重調整して超遠心分離法（１０℃で１２０，０００×g、４８時間）にて比重１．０６３～１．２１の部分、HDL画分として回収した。この際、HDLの
10 純度は、アガロース電気泳動法にて単一の鋭いバンドが得られることにより確認した。

次に、このHDL画分を、０．２５mmol/L EDTAを含むPBS（pH 7．４）に対して十分（１６時間）透析することによって精製した。さらに、このようにして精製されたHDLを、HDLタンパク質濃度が１mg/mLとなる
15 ように０．２５mmol/L EDTAを含むPBS（pH 7．４）に溶解し、使用するまで４℃で保存した。なお、本実施例において、タンパク質量は、実施例 1（１）に記載のLowry modified Methodを使用した。

（２）HDLの酸化

（１）で調製されたHDLを、５００～１０００倍容以上のEDTAを含まないPBS（pH 7．４）に対して３回以上（２時間以上／回）透析することによ
20 ってEDTAを除去し、HDLの濃度が１００μg/mLとなるようにEDTAを含まないPBS（pH 7．４）に溶かした。次に、このHDL溶液１０mLに、硫酸銅（CuSO₄）を終濃度が１０μmol/Lとなるように添加し、３７℃で１８時間インキュベートすることにより、HDLを酸化した。さらに、この溶液
25 に、EDTAを終濃度が１mmol/Lとなるように添加することにより、酸化反応を停止した後、５００～１０００倍容以上のEDTAを１mmol/L含むPB

S (pH 7.4) に対して3回以上 (2時間以上/回) 透析することにより、 CuSO_4 を除去し、酸化HDLを調製し、これを4°Cで保存した。

なお、本実施例において、酸化HDL量の表現は、原料であるHDLのタンパク質量で定義した。

5 (3) 酸化HDLの凍結乾燥品の調製

(2) で調製された酸化HDLに、BSAを終濃度2 (w/v) %に、及びシクロロスを終濃度5 (w/v) %になるように、それぞれ添加して、よく混和した後、ガラス瓶に1 mLずつ分注し、共和真空凍結乾燥装置 RL-201BS (共和真空技術株式会社製) を用いて、-50°Cで16時間凍結した後、2
10 0°Cで、1.33 Paの減圧下で48時間凍結乾燥することによって、水分を気化・除去させた後、密栓し、4°Cで保存した。なお、この際、凍結乾燥品中の水分含量は0.8質量%であった。

(4) 酸化HDLの凍結乾燥品を標準品として用いた検量線の作成

a. 濃度調整

15 (3) で調製された酸化HDLの凍結乾燥品に精製水1 mLを加えて溶解後、1 (w/v) % BSAを含むPBSで所定濃度 (0 ng/mL、3.125 ng/mL、6.25 ng/mL、12.5 ng/mL、25 ng/mL、50 ng/mL、及び75 ng/mL) となるように希釈した。

b. サンドイッチELISA分析

20 96F マイクロプレート (ヌンク社製) の各ウェルに、炭酸バッファー (pH 9.5) で10 $\mu\text{g/mL}$ の濃度に希釈された抗ヒトアポAIマウスモノクロナール抗体 (ケミコン社製) 溶液0.1 mL/ウェルを各ウェルに加えて、4°Cで16時間インキュベートした。抗体溶液を捨て、1 (w/v) % BSAを含むPBS (pH 7.4) 350 μL を加えて室温で2時間インキュベートすること
25 によりブロッキングした後、0.05 (v/v) % Tween 20を含むPBS (pH 7.4) で4回洗浄した。

26

次に、上記a. で調製された所定濃度の酸化HDL凍結乾燥品を含む希釈液を、それぞれ、100 μ Lずつウェルに分注し、室温で2時間インキュベートした後、0.05 (v/v) % Tween 20を含むPBS (pH 7.4) で4回洗浄した。

- 5 さらに、各ウェルに、1 (w/v) % BSAを含むPBS (pH 7.4) で150倍に希釈されたDLH3抗体100 μ Lを加えて、室温で1時間インキュベートした。次に、0.05 (v/v) % Tween 20を含むPBS (pH 7.4) で4回洗浄した後、1 (w/v) % BSAを含むPBSで1000倍に希釈されたペルオキシダーゼ標識抗マウスIgM抗体(ザイメット社製) 100 μ L
- 10 を加えて、室温で30分間インキュベートした。0.05 (v/v) % Tween 20を含むPBS (pH 7.4) で4回洗浄した後、オーフェニレンジアミン3mg/mLを含む0.03 (w/v) % 過酸化水素水100 μ Lを加えて発色させ、30分間放置した後、1mol/L硫酸50 μ Lを加えて反応を停止させ、492nmの吸光度を測定した。その結果を第3図に示す。第3図に示されるよ
- 15 うに、本発明の酸化HDLの凍結乾燥品を用いてきれいな検量線が作成できた。

(5) 保存安定性の比較

- (3) で調製された酸化HDLの凍結乾燥品[酸化HDL標準品(1)(Hタイプ) : 12.5 ng ; 及び酸化HDL標準品(2) : 6.25 ng (Lタイプ)] を、所定期間(0、1、2、3、4週間) 4℃で保存した。また、(2)
- 20 で調製された酸化HDLを、タンパク質濃度が6.25 ng/mL (「Lタイプ」と称する) 及び12.5 ng/mL (「Hタイプ」と称する) になるようにPBS (pH 7.4) で希釈した後、さらにBSAを終濃度2 (w/v) %に、及びシュクロースを終濃度5 (w/v) %になるようにそれぞれ添加して、よく混和した。この混合溶液を凍結乾燥せずにそのまま4℃で冷蔵保存したもの[そ
- 25 れぞれ、酸化HDL比較品(1)(Hタイプ) : 12.5 ng/mL ; 及び酸化HDL比較品(2) : 6.25 ng/mL (Lタイプ) とする] を、所定期間

(0、1、2、3、4週間) 4℃で保存した。

所定期間保存した後、酸化HDL標準品(1)及び(2)に精製水1 mLを加え溶解したものならびに酸化HDL比較品(1)及び(2)について、それぞれ、上記(4) b.と同様の操作を行ない、492 nmの吸光度を測定した。その結果を第4図に示す。

第4図から示されるように、本発明による凍結乾燥された酸化HDL標準品(1)及び(2)では、調製直後(0週)に比較して測定値がほとんど変動しないのに対して、冷蔵保存された酸化HDL比較品(1)及び(2)では、調製直後(0週)に比較して測定値が、それぞれ、約40%及び約30%低下しており、発明による酸化HDL標準品(1)及び(2)に比して保存安定性がかなり劣ることが分かる。

実施例3

(1) Lp(a)の調製

EDTAを抗凝固剤として得たヒト血漿から超遠心分離法(15℃で120,000×g、48時間)にて比重1.060~1.125の部分回収し、さらにバイオゲルA-5m(バイオラッド社製)でゲル濾過し、Lp(a)画分を回収した。この際、Lp(a)の純度は、アガロース電気泳動法にて単一の鋭いバンドを示すことによって確認した。

次に、このLp(a)画分を、0.25 mmol/L EDTAを含むPBS(pH 7.4)に対して十分(16時間)透析することによって精製した。さらに、このようにして精製されたLp(a)を、Lp(a)タンパク質濃度が1 mg/mLとなるように0.25 mmol/L EDTAを含むPBS(pH 7.4)に溶解し、使用するまで4℃で保存した。なお、本実施例において、タンパク質量は、実施例1(1)に記載のLowry modified Methodを使用した。

(2) Lp(a)の酸化

(1)で調製されたLp(a)を、500~1000倍容以上のEDTAを含

まないPBS (pH 7.4) に対して3回以上(2時間以上/回) 透析することによってEDTAを除去し、Lp (a) の濃度が100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるようにEDTAを含まないPBS (pH 7.4) に溶かした。次に、このLp (a) 溶液10 mLに、硫酸銅 (CuSO_4) を終濃度が10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ となるように添
5 加し、37°Cで18時間インキュベートすることにより、Lp (a) を酸化した。さらに、この溶液に、EDTAを終濃度が1 mmol/L となるように添加することにより、酸化反応を停止した後、EDTAを1 mmol/L 含むPBS (pH 7.4) に対して500~1000倍容で2~3回(2時間以上/回) 透析することにより、 CuSO_4 を除去し、酸化Lp (a) を調製し、これを4°Cで保存した。

10 なお、本実施例において、酸化Lp (a) 量の表現は、原料であるLp (a) のタンパク質量で定義した。

(3) 酸化Lp (a) の凍結乾燥品の調製

(2) で調製された酸化Lp (a) に、BSAを終濃度2 (w/v) %に、及びシュクロースを終濃度5 (w/v) %になるように、それぞれ添加して、よく
15 混和した後、ガラス瓶に1 mLずつ分注し、共和真空凍結乾燥装置 RL-201BS (共和真空技術株式会社製) を用いて、-50°Cで16時間凍結した後、20°Cで、1.33 Paの減圧下で48時間凍結乾燥することによって、水分を気化・除去させた後、密栓し、4°Cで保存した。なお、この際、凍結乾燥品中の水分含量は0.8質量%であった。

(4) 酸化Lp (a) の凍結乾燥品を標準品として用いた検量線の作成

a. 濃度調整

(3) で調製された酸化Lp (a) の凍結乾燥品を、所定濃度(0 ng/mL 、0.15625 ng/mL 、0.3125 ng/mL 、0.625 ng/mL 、1.25 ng/mL 、2.5 ng/mL 、及び5 ng/mL) となるように、精
25 製水1 mL中に溶解した。

b. サンドイッチELISA分析

96F マイクロプレート（ヌンク社製）の各ウェルに、抗ヒトLp（a）マウスモノクローナル抗体（ケミコン社製）を炭酸バッファー（pH9.5）で10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈したものを、1 $\mu\text{g}/\text{ウェル}$ となるように加えて、4℃で16時間インキュベートした。抗体溶液を捨て、1（w/v）%BSAを含むPBS（pH7.4）350 μL を加えて室温で2時間インキュベートすることによりブロッキングした後、0.05（v/v）%Tween20を含むPBS（pH7.4）で4回洗浄した。

次に、上記a.で調製された所定濃度の酸化Lp（a）凍結乾燥品を含む水溶液を、それぞれ、100 μL ずつウェルに分注し、室温で2時間インキュベートした後、0.05（v/v）%Tween20を含むPBS（pH7.4）で4回洗浄した。

さらに、各ウェルに、実施例1（4）b.で調製されたDLH3抗体を1（w/v）%BSAを含有する20mmol/L Tris-HCl溶液（pH7.4）で10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度に希釈された希釈液100 μL を加えて、室温で15時間インキュベートした。次に、0.05（v/v）%Tween20を含むPBS（pH7.4）で4回洗浄した後、1（w/v）%BSAを含むPBSで1000倍に希釈されたペルオキシダーゼ標識抗マウスIgM抗体（ケミコン社製）100 μL を加えて、室温で30分間インキュベートした。0.05（v/v）%Tween20を含むPBS（pH7.4）で4回洗浄した後、o-フェニレンジアミン3mg/mLを含む0.03（w/v）%過酸化水素水100 μL を加えて30分間発色させた後、1mol/L硫酸50 μL を加えて反応を停止させ、492nmの吸光度を測定した。その結果を第5図に示す。第5図に示されるように、本発明の酸化Lp（a）の凍結乾燥品を用いてきれいな検量線が作成できた。

25 （5）保存安定性の比較

（3）で調製された酸化Lp（a）の凍結乾燥品〔酸化Lp（a）標準品

30

(1) (Hタイプ) : 12.5 ng ; 及び酸化Lp (a) 標準品 (2) : 6.25 ng (Lタイプ)] を、所定期間 (0、1、2、3、4 週間) 4℃で保存した。また、(2) で調製された酸化Lp (a) を、タンパク質濃度が6.25 ng/mL (「Lタイプ」と称する) 及び12.5 ng/mL (「Hタイプ」と称する) になるようにPBS (pH 7.4) で希釈した後、さらにBSAを終濃度2 (w/v) %に、及びシュクロースを終濃度5 (w/v) %になるようにそれぞれ添加して、よく混和した。この混合溶液を凍結乾燥せずにそのまま4℃で冷蔵保存したもの [それぞれ、酸化Lp (a) 比較品 (1) (Hタイプ) : 12.5 ng/mL ; 及び酸化Lp (a) 比較品 (2) : 6.25 ng/mL (Lタイプ) とする] を、所定期間 (0、1、2、3、4 週間) 4℃で保存した。

所定期間保存した後、酸化Lp (a) 標準品 (1) 及び (2) に精製水1 mLを加え溶解したものならびに酸化Lp (a) 比較品 (1) 及び (2) について、それぞれ、上記 (4) b. と同様の操作を行ない、492 nmの吸光度を測定した。その結果を第6図に示す。

第6図から示されるように、本発明による凍結乾燥された酸化Lp (a) 標準品 (1) 及び (2) では、調製直後 (0 週) に比較して測定値がほとんど変動しないのに対して、冷蔵保存された酸化Lp (a) 比較品 (1) 及び (2) では、調製直後 (0 週) に比較して測定値が、4 週間経過後では、それぞれ、約50% 及び約40%低下しており、発明による酸化Lp (a) 標準品 (1) 及び (2) に比して保存安定性がかなり劣ることが分かる。

実施例 4

(1) 凍結変性ヒト血漿の調製

被検者4人より抗凝固剤としてヘパリンを用いて採血し、常法を用いて血漿を採取し、実施例1 (4) に記載されるELISA法と同様の方法に従って、分析した。

次に、各血漿をガラス瓶に2 mLずつ分注し、室温 (25℃) から庫内温度一

3 1

30℃のフリーザーに移し、3時間以上経過させた後、室温に戻し、完全に内容物を融解した。この凍結を含む工程を施した各自血漿を、実施例1(4)に記載されるELISA法と同様の方法に従って、分析した。これらの結果を、第7図に示す。第7図に示されるように、血漿に対して凍結を含む工程を施すことにより、血漿中に含まれるリポタンパク質が有意に変性され、凍結変性リポタンパク質(酸化LDL)が生産されていることが確認できる。

(2) 凍結変性ヒト血漿の凍結乾燥品の調製

上記(1)の凍結を含む工程を計4回施された各自血漿をそれぞれ等容混合し、この混合液について、実施例1(4)に記載されるELISA法に従って実施例1(4)に示される検量線から変性LDL(酸化LDL)濃度を算出した。

次に、(1)で調製された凍結変性ヒト血漿を、酸化LDL濃度が6.25 ng/mL(Lタイプ)及び12.5 ng/mL(Hタイプ)になるように、140 mmol/L NaCl、終濃度2(w/v)%BSA、終濃度5(w/v)%シュクロース、0.25 mmol/L EDTA-2Naを含む10 mmol/L リン酸緩衝液(pH 7.4)で希釈した。次に、この希釈液をガラス瓶に1 mLずつ分注し、共和真空凍結乾燥装置 RL-201BS(共和真空技術株式会社製)を用いて、-50℃で16時間凍結した後、5℃で、1.33 Paの減圧下で48時間凍結乾燥することにより、水分を気化・除去させた後、密栓し、使用するまで4℃で保存し、これを凍結変性ヒト血漿の凍結乾燥品とした。

なお、この凍結乾燥品中の水分含量は0.8質量%であった。

(3) 凍結変性ヒト血漿の凍結乾燥品の濃度測定

(2)で調製された凍結変性ヒト血漿の凍結乾燥品に精製水1 mLを加えて溶解した後、この溶液について、実施例1(4)に記載されるサンドイッチELISA法による酸化LDLの測定方法に従って、492 nmの吸光度を測定し、この値から実施例1(4)で作成された検量線を用いて酸化LDL濃度を確認したところ、凍結乾燥品中の酸化LDL濃度の変化は凍結乾燥工程前後でほとんど認

められなかった。

(4) 保存安定性の比較

(2) で調製された凍結変性ヒト血漿の凍結乾燥品〔凍結変性ヒト血漿標準品 (1) (Hタイプ) : 12.5 ng ; 及び凍結変性ヒト血漿標準品 (2) (Lタイプ) : 6.25 ng (Lタイプ) 〕を、所定期間 (0、6、12ヶ月間) 4℃で保存した。また、実施例 1 (3) で調製された酸化LDL凍結乾燥品〔酸化LDL標準品 (1) (Hタイプ) : 12.5 ng ; 及び酸化LDL標準品 (2) (Lタイプ) : 6.25 ng 〕を、所定期間 (0、6、12ヶ月間) 4℃で保存した。

所定期間保存した後、凍結変性ヒト血漿標準品 (1) 及び (2) ならびに酸化LDL標準品 (1) 及び (2) に精製水 1 mL を加えて溶解し、この溶液を、実施例 1 (4) に記載される ELISA 法と同様の方法に従って、分析した。その結果を下記第 1 表に示す。

第 1 表

保存期間 (月)	OD ₄₉₂			
	凍結変性ヒト 血漿標準品 (1)	凍結変性ヒト 血漿標準品 (2)	酸化LDL 標準品 (1)	酸化LDL 標準品 (2)
0	0.740	0.272	0.758	0.283
6	0.727	0.270	0.508	0.222
12	0.677	0.274	0.430	0.207

第 1 表から示されるように、本発明による酸化LDL標準品も低濃度〔酸化LDL標準品 (2) 〕であれば保存安定性に優れているが、凍結によりリポタンパク質の変性を行なった後、さらに凍結乾燥により安定化した本発明による凍結変性ヒト血漿標準品は、濃度が高くなっても〔凍結変性ヒト血漿標準品 (1) 〕、本発明の酸化LDL標準品に比べて、有意に長期間の保存安定性に優れているこ

とが分かる。

実施例 5

(1) 凍結変性ヒト血清の調製

被検者 4 人より採血し、常法を用いて血清を分離して混合した。この血清に、
5 BSAを終濃度 2 (w/v) %に、及びシュクロースを終濃度 5 (w/v) %になるように、それぞれ添加して、よく混和した後、ガラス瓶に 2 mL ずつ分注し、共和真空凍結乾燥装置 RL-201BS (共和真空技術株式会社製) を用いて、
-50°C で 16 時間凍結した後、5°C で、1.33 Pa の減圧下で 48 時間凍結乾燥することによって、水分を気化・除去させた後、密栓し、4°C で保存した。
10 なお、この凍結乾燥品中の水分含量は 0.8 質量%であった。

(2) 凍結変性ヒト血清の凍結乾燥品の調製

(1) で調製された凍結変性ヒト血清を含むガラス瓶に、2 mL の精製水を加えて内容物を十分溶解した。この溶解液について、実施例 1 (4) に記載される ELISA 法による酸化 LDL の測定方法に従って、実施例 1 (4) で作成され
15 た検量線から酸化 LDL 濃度を算出した。

次に、(1) で調製された凍結変性ヒト血清を、酸化 LDL 濃度を 6.25 ng/mL (L タイプ) 及び 12.5 ng/mL (H タイプ) になるように、140 mmol/L NaCl、終濃度 2 (w/v) % BSA、終濃度 5 (w/v) % シュクロース、0.25 mmol/L EDTA-2Na を含む 10 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4) で希釈した。次に、この希釈液をガラス
20 瓶に 1 mL ずつ分注し、共和真空凍結乾燥装置 RL-201BS (共和真空技術株式会社製) を用いて、-50°C で 16 時間凍結した後、5°C で、1.33 Pa の減圧下で 48 時間凍結乾燥することにより、水分を気化・除去させた後、密栓し、使用するまで 4°C で保存し、これを凍結変性ヒト血清の凍結乾燥品とした。
25 なお、この凍結乾燥品中の水分含量は 0.8 質量%であった。

(3) 凍結変性ヒト血清の凍結乾燥品の濃度測定

(2) で調製された凍結変性ヒト血清の凍結乾燥品に精製水 1 mL を加えて溶解した後、この溶液について、実施例 1 (4) に記載される ELISA 法による酸化 LDL の測定方法に従って、実施例 1 (4) で作成された検量線から酸化 LDL 濃度を確認したところ、凍結乾燥品中の酸化 LDL 濃度の変化は凍結乾燥工程前後でほとんど認められなかった。

(4) 溶解後保存安定性の比較

(2) で調製された凍結変性ヒト血清の凍結乾燥品を、それぞれ、精製水 1 mL を加えて溶解し、酸化 LDL 濃度がそれぞれ 12.5 ng/mL 及び 6.25 ng/mL の凍結変性ヒト血清標準品 (1) (H タイプ) 及び (2) (L タイプ) とし、これらを所定期間 (0、3、7、10、14 日間) 4°C で保存した。

また、実施例 1 (3) で調製された酸化 LDL の凍結乾燥品もまた上記と同様にして溶解して、酸化 LDL 濃度がそれぞれ 12.5 ng/mL 及び 6.25 ng/mL である酸化 LDL 標準品 (3) (H タイプ) 及び (4) とし、同様にして、所定期間 (0、3、7、10、14 日間)、4°C で溶解状態で保存した。

所定期間保存した後、凍結変性ヒト血清標準品 (1) 及び (2) ならびに酸化 LDL 標準品 (3) 及び (4) について、それぞれ、実施例 1 (4) に記載されるサンドイッチ ELISA 法による酸化 LDL の測定方法に従って、分析した。その結果を下記第 2 表及び第 8 図に示す。

35

第2表

保存期間 (日)	OD ₄₉₂			
	凍結変性ヒト 血清標準品 (1)	凍結変性ヒト 血清標準品 (2)	酸化LDL 標準品 (3)	酸化LDL 標準品 (4)
0	0.8175	0.3693	0.7689	0.3608
3	0.8107	0.3533	0.6762	0.3615
7	0.7602	0.3387	0.6705	0.3473
10	0.7800	0.3440	0.5772	0.3240
14	0.7630	0.3400	0.5760	0.2985

第2表から示されるように、本発明による酸化LDL標準品も低濃度〔酸化LDL標準品(4)〕であれば溶解後の保存安定性に優れているものの、凍結によりリポタンパク質の変性を行なった後、さらに凍結乾燥により安定化した本発明による凍結変性ヒト血清標準品は、濃度が高くなっても〔凍結変性ヒト血清標準品(1)〕、本発明の酸化LDL標準品に比べて、有意に溶解後の保存安定性に優れていることが分かる。

実施例6

(1) 凍結変性LDLの調製

実施例1(1)で調製されたLDLを、500~1000倍容以上のEDTAを含まないPBS(pH7.4)に対して3回以上(2時間以上/回)透析することによってEDTAを除去し、LDLの濃度が1mg/mLとなるように、140mmol/L NaCl、終濃度2(w/v)%BSA、終濃度5(w/v)%シュクロース、0.25mmol/L EDTA-2Naを含む10mmol/L リン酸緩衝液(pH7.4)で希釈し、よく混和した。次に、この希釈液をガラス瓶に2mLずつ分注し、室温(22℃)から庫内温度がそれぞれ-85℃及び-30℃のフリーザーに移し、1時間以上経過させた後、室温に戻し、

36

完全に内容物を融解した。上記凍結・融解を含む工程を計10回繰り返した。また、上記凍結・融解を含む工程間に、内容物の一部を回収した後、このサンプルについて、実施例1(4)に記載されるサンドイッチELISA法に従って、分析した。これらの結果を、第9図に示す。

- 5 第9図から示されるように、庫内温度が -30°C では凍結・融解を含む工程を3回繰り返せばLDLの変性はほぼ飽和状態に達するのに対して、庫内温度が -85°C では凍結・融解を含む工程を9回位繰り返さないとLDLの変性は飽和状態に達せず、降温温度によって変性LDLの生産量が異なることが示される。

(2) 凍結変性LDLの凍結乾燥品の調製

- 10 (1)において庫内温度が -30°C での凍結を含む工程を計4回施すことにより調製された凍結変性LDLを、酸化LDL濃度が 6.25 ng/mL (Lタイプ) 及び 12.5 ng/mL (Hタイプ) になるように、 140 mmol/L NaCl、終濃度2 (w/v) % BSA、終濃度5 (w/v) % シュクロース、 0.25 mmol/L EDTA-2Naを含む 10 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4) で希釈した。次に、この希釈液をガラス瓶に1 mLずつ分注し、共和真空凍結乾燥装置 RL-201BS (共和真空技術株式会社製) を用いて、 -50°C で16時間凍結した後、 5°C で、 1.33 Pa の減圧下で48時間凍結乾燥することにより、水分を気化・除去させた後、密栓し、使用するまで 4°C で保存し、これを凍結変性LDLの凍結乾燥品とした。なお、この凍結乾燥品中の水分含量は0.8質量%であった。
- 15
- 20

(3) 凍結変性LDLの凍結乾燥品の濃度測定

- (2)で調製された凍結変性LDLの凍結乾燥品に精製水1 mLを加えて溶解した後、この溶液について、実施例1(4)に記載されるELISA法による酸化LDLの測定方法に従って、実施例1(4)で作成された検量線から酸化LDL濃度をを確認したところ、凍結乾燥品中の酸化LDL濃度の変化は凍結乾燥工程前後でほとんど認められなかった。
- 25

(4) 溶解後保存安定性の比較

(2) で調製された凍結変性LDLの凍結乾燥品を、それぞれ、精製水1 mLを加えて溶解し、酸化LDL濃度がそれぞれ12.5 ng/mL及び6.25 ng/mLの凍結変性LDL標準品(1) (Hタイプ) 及び(2) (Lタイプ) とし、これらを所定期間(0、3、7、10、14日間) 4°Cで保存した。また、実施例1(3) で調製された酸化LDLの凍結乾燥品もまた上記と同様にして溶解して、酸化LDL濃度がそれぞれ12.5 ng/mL及び6.25 ng/mLである酸化LDL標準品(3) (Hタイプ) 及び(4) とし、同様にして、所定期間(0、3、7、10、14日間) 4°Cで溶解状態で保存した。

所定期間保存した後、凍結変性LDL標準品(1) 及び(2) ならびに酸化LDL標準品(3) 及び(4) について、それぞれ、実施例1(4) に記載されるサンドイッチELISA法による酸化LDLの測定方法に従って、492 nmの吸光度を測定し、この値から実施例1(4) で作成された検量線を用いて、各標準品中の酸化LDLを算出した。その結果を下記第3表及び第10図に示す。

第3表

保存期間 (日)	OD ₄₉₂			
	凍結変性LDL 標準品(1)	凍結変性LDL 標準品(2)	酸化LDL 標準品(3)	酸化LDL 標準品(4)
0	0.8633	0.3826	0.7689	0.3608
3	0.8265	0.3532	0.6762	0.3615
7	0.7924	0.3516	0.6705	0.3473
10	0.7952	0.3439	0.5772	0.3240
14	0.7886	0.3476	0.5760	0.2985

第3表から示されるように、本発明による酸化LDL標準品も低濃度 [酸化L

DL標準品(4)]であれば溶解後の保存安定性に優れているものの、凍結によりリポタンパク質の変性を行なった後、さらに凍結乾燥により安定化した本発明による凍結変性ヒト血清標準品は、濃度が高くなっても[凍結変性LDL標準品(1)]、本発明の酸化LDL標準品に比べて、有意に溶解後の保存安定性に優れていることが分かる。

産業上の利用可能性

上述したように、本発明は、リポタンパク質を人工的に変性させて得られた変性リポタンパク質を凍結乾燥することによって得られる保存安定性に優れた変性リポタンパク質およびそれを製造する方法に関するものである。また、本発明は、変性リポタンパク質を含有する溶液に対し少なくとも一回の凍結を含む工程を加えて該溶液中に含まれるリポタンパク質を変性することからなる変性リポタンパク質の製造方法；ならびにこのような方法によって得られた変性リポタンパク質をさらに凍結乾燥することによって得られる保存安定性に優れた変性リポタンパク質およびそれを製造する方法に関するものである。変性リポタンパク質は、心筋梗塞や狭心症などの冠動脈系疾患、脳梗塞や脳血管系痴呆などの脳動脈系疾患、あるいは腎症、糖尿病性腎症などの腎動脈系疾患ならびに末梢動脈閉塞症のような末梢動脈系疾患などの各種循環器系疾患と強く関係することが示唆されており、血液中の変性リポタンパク質量の測定用の標準物質や変性リポタンパク質の生理的役割や生理活性を調べるための試薬はこれらの試験の結果を左右する非常に重要な物質である。

したがって、本発明の方法により、保存安定性に優れた、換言すると常に一定の測定値を示す変性リポタンパク質が製造することが可能になった。上記利点に加えて、変性リポタンパク質を含有する溶液に対し少なくとも一回の凍結を含む工程を加えて変性させた変性リポタンパク質を凍結乾燥することにより得られた安定化リポタンパク質は、保存安定性のみならず溶解後の保存安定性にも優れて

いるため、本発明に係る安定化変性リポタンパク質を実際に使用する形態である溶液の形態にした場合の安定性にも優れているため、変性リポタンパク質の測定にあたって非常に有益である。

このため、本発明による安定化変性リポタンパク質は、例えば、変性リポタン

5 蛋白を認識する抗体と接触させ、該抗体の試料に対する反応性を測定すること
 によって血液成分中に含まれる変性リポタンパク質を測定する方法において用い
 られる標準物質や、変性リポタンパク質の生理的役割や生理活性を調べるための
 各種実験用の試薬として有用であり、さらに、上記したような諸目的での診断技
 術の商品化や試薬の開発において非常に重要な影響を与えることは明白である。

40

請求の範囲

1. リポタンパク質を人工的に変性させ、変性リポタンパク質を得、該変性リポタンパク質を凍結乾燥することにより該変性リポタンパク質を安定化することからなる安定化変性リポタンパク質の製造方法。
5
2. 該リポタンパク質はヒトリポタンパク質である、請求の範囲第1項に記載の方法。
3. 該リポタンパク質はカイロミクロン、VLDL、LDL、Lp(a)、HDL2及びHDL3からなる群より選ばれる少なくとも一種である、請求の範囲
10 第1項または第2項に記載の方法。
4. 該変性リポタンパク質はリポタンパク質を金属イオンの存在下で酸化することによって得られる、請求の範囲第1項から第3項のいずれか1項に記載の方法。
5. 該金属イオンは銅イオン、鉄イオンまたはこれらの混合物である、請求の
15 範囲第4項に記載の方法。
6. 該変性リポタンパク質はリポタンパク質をアセチル化することによって得られる、請求の範囲第1項から第3項のいずれか1項に記載の方法。
7. 該変性リポタンパク質はリポタンパク質をマロンジアルデヒドを用いてアルデヒド化することによって得られる、請求の範囲第1項から第3項のいずれか
20 1項に記載の方法。
8. 安定化剤を添加する工程をさらに含む、請求の範囲第1項から第7項のいずれか1項に記載の方法。
9. 該安定化剤はシュクロース、ラクトース、トレハロース、ウシ血清アルブミン(BSA)及びヒト血清アルブミン(HSA)からなる群より選ばれる少なくとも一種である、請求の範囲第8項に記載の方法。
25
10. リポタンパク質を含有する溶液に対し少なくとも一回の凍結を含む工程

4 1

を加えることにより、該溶液中に含まれるリボタンパク質を変性することからなる変性リボタンパク質の製造方法。

1 1. 該変性リボタンパク質は血液中の変性リボタンパク質量の測定用の標準物質または変性リボタンパク質の生理的役割や生理活性を調べるための実験用試薬として使用される、請求の範囲第 1 0 項に記載の方法。

1 2. 該変性リボタンパク質は酸化リボタンパク質またはアルデヒド化リボタンパク質である、請求の範囲第 1 0 項または第 1 1 項に記載の方法。

1 3. 該変性リボタンパク質は、ハイブリドーマセルライン Mouse-Mouse hybridoma FOH1a/DLH3 (受託番号: F E R M B P - 7 1 7 1) により產生される D L H 3 抗体と反応するものである、請求の範囲第 1 0 項または第 1 1 項に記載の方法。

1 4. リボタンパク質を含有する溶液に対し少なくとも一回の凍結を含む工程を加えて該溶液中に含まれる中に含まれるリボタンパク質を変性させ、変性リボタンパク質を得、該変性リボタンパク質をさらに凍結乾燥することにより該変性リボタンパク質を安定化することからなる安定化変性リボタンパク質の製造方法。

1 5. 請求の範囲第 1 項から第 9 項のいずれか 1 項または請求の範囲第 1 4 項に記載の方法によって製造される安定化変性リボタンパク質。

1 6. 請求の範囲第 1 5 項に記載の安定化変性リボタンパク質を標準物質として使用する変性リボタンパク質の測定方法。

1 7. 該安定化変性リボタンパク質は免疫学的測定法における標準物質として使用される、請求の範囲第 1 6 項に記載の方法。

1 8. 該免疫学的測定法はラジオイムノアッセイ、エンザイムイムノアッセイ、蛍光イムノアッセイ、発光イムノアッセイ、凝集イムノアッセイ、免疫比濁法及び免疫比濁法から選ばれる、請求の範囲第 1 7 項に記載の方法。

1 9. 該免疫学的測定法は競合法またはサンドイッチ法である、請求の範囲第 1 7 項に記載の方法。

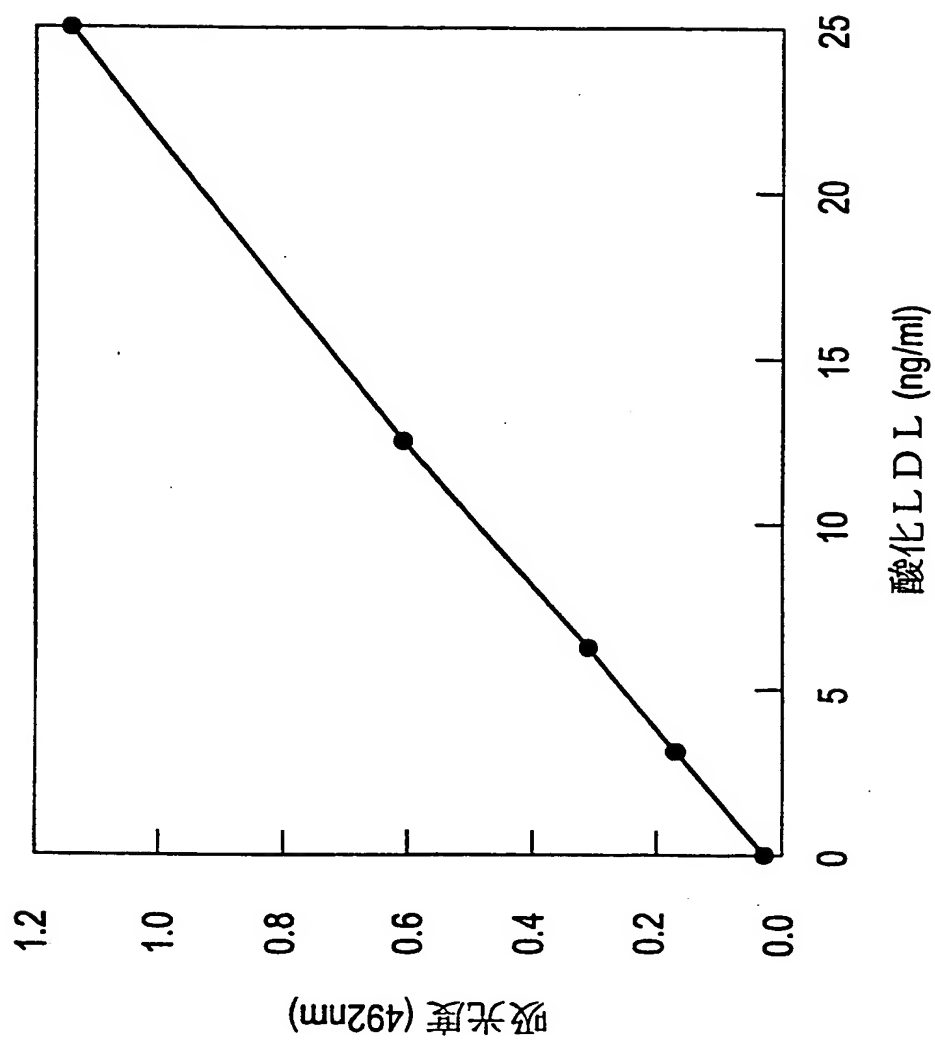
4 2

20. 請求の範囲第15項に記載の安定化変性リポタンパク質を標準物質として含有する変性リポタンパク質の測定用の試薬キット。

21. 検体希釈液、抗体固相化固相、反応用緩衝液、洗浄液、標識化2次抗体、検出用試薬、および標準物質としての請求の範囲第15項に記載の安定化変性リポタンパク質の全部または一部を構成要素として含む変性リポタンパク質の測定用の試薬キット。

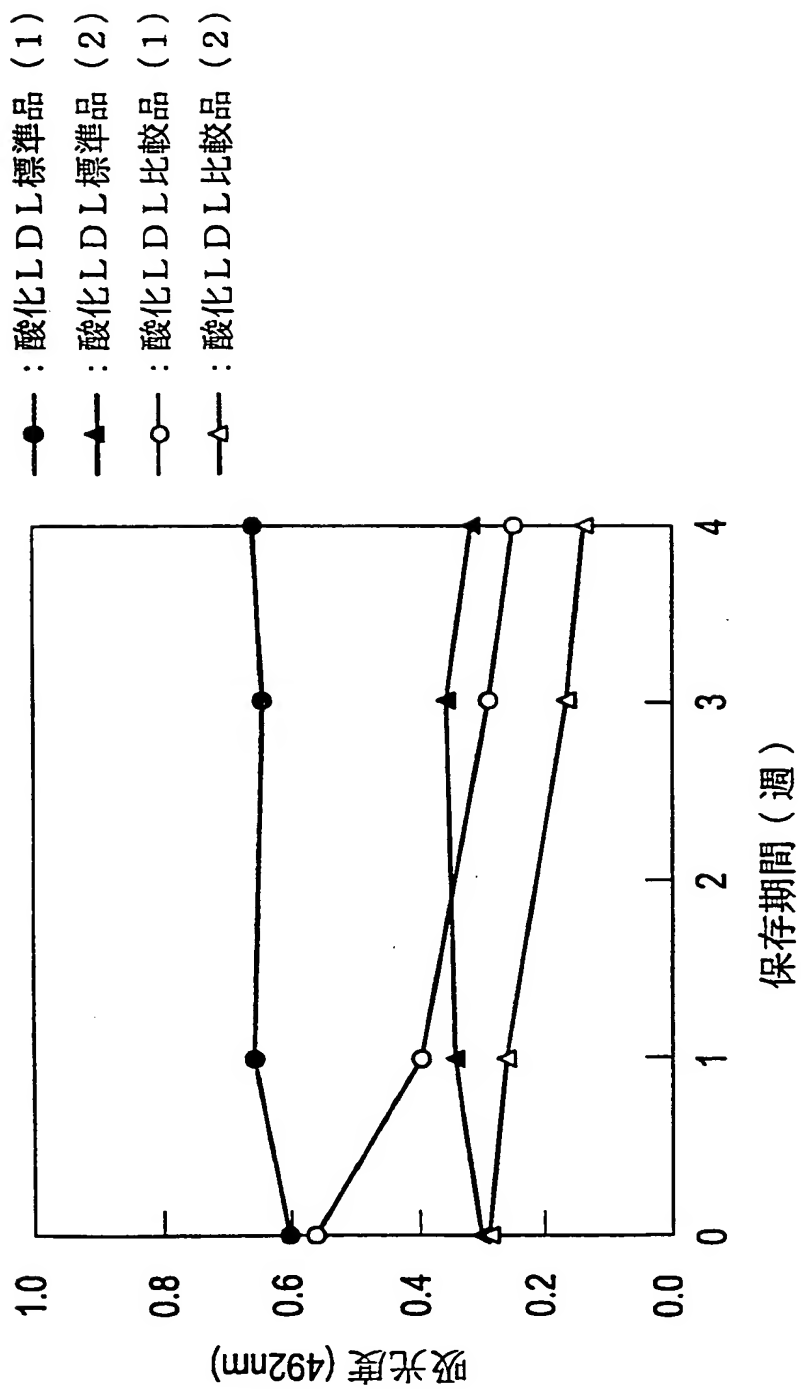
$1/\theta$

第1図



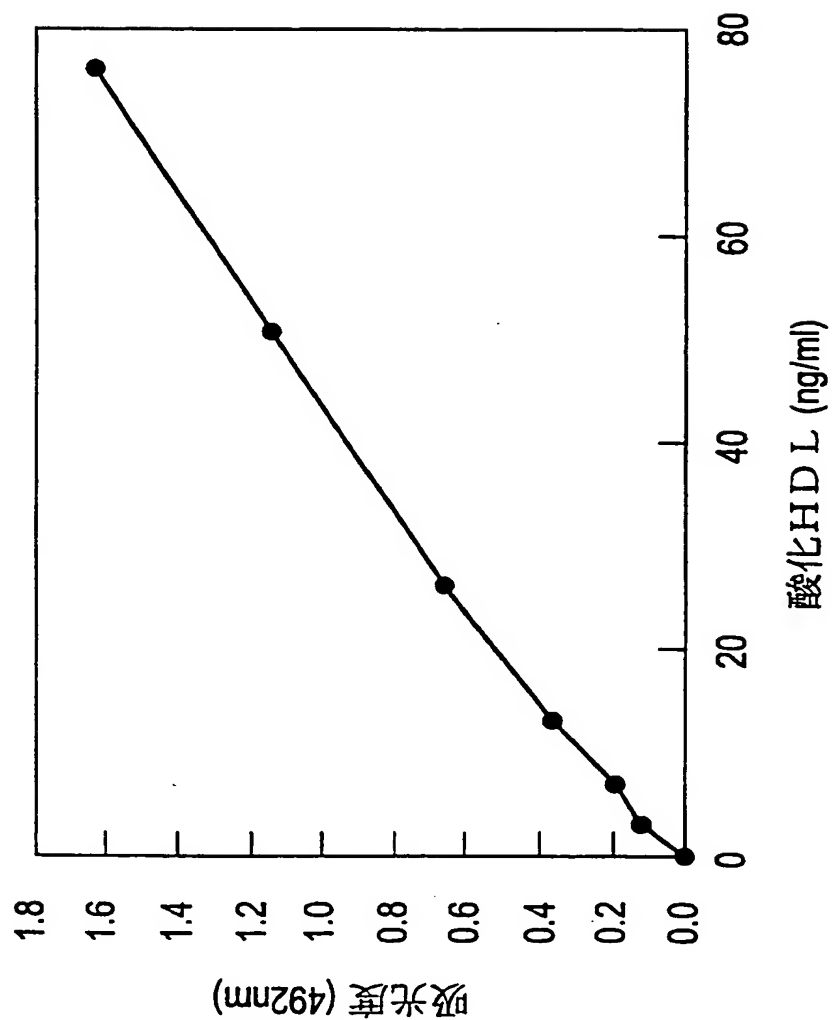
$$2 \theta / -1$$

第2図



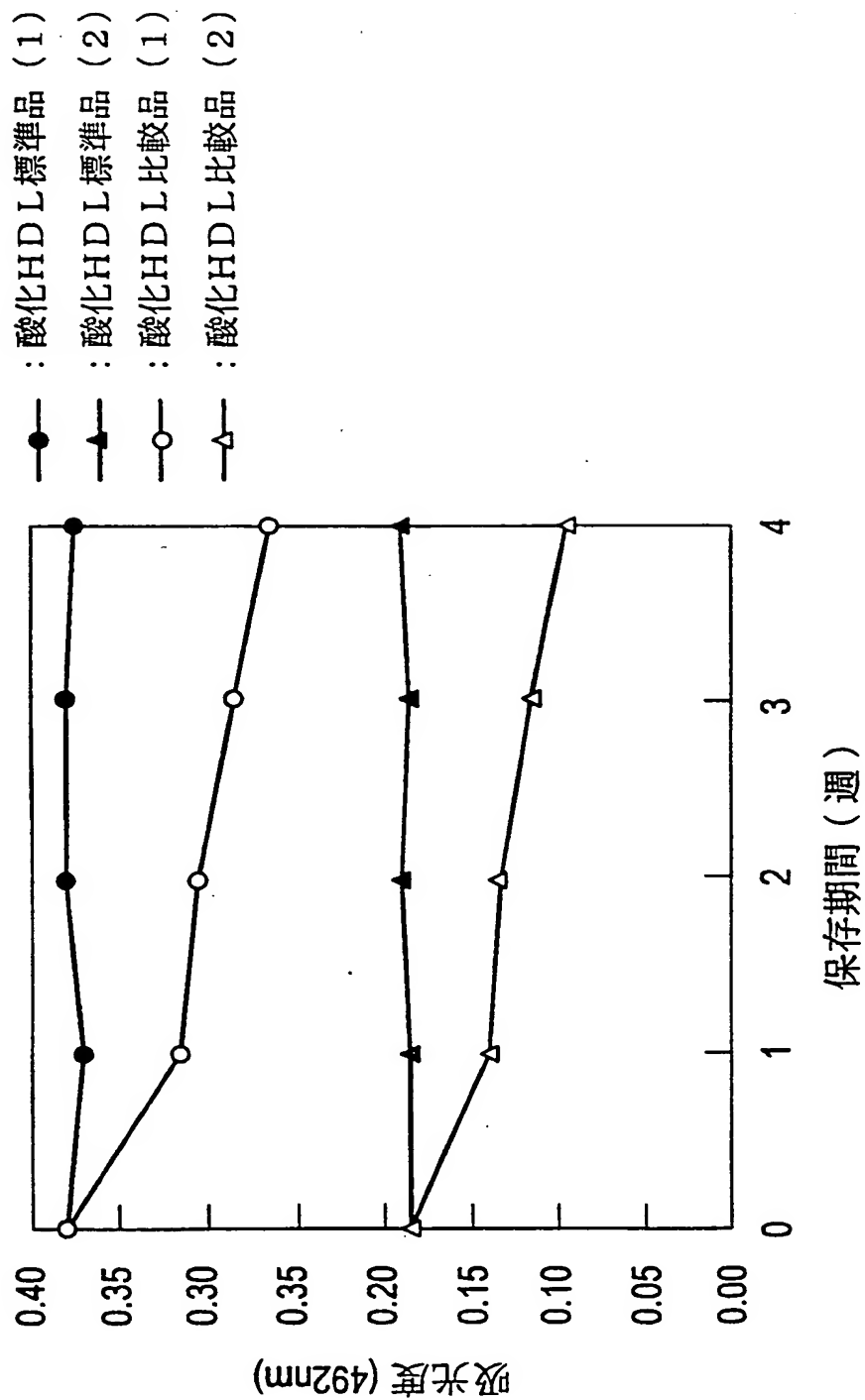
3 / 10

第3図



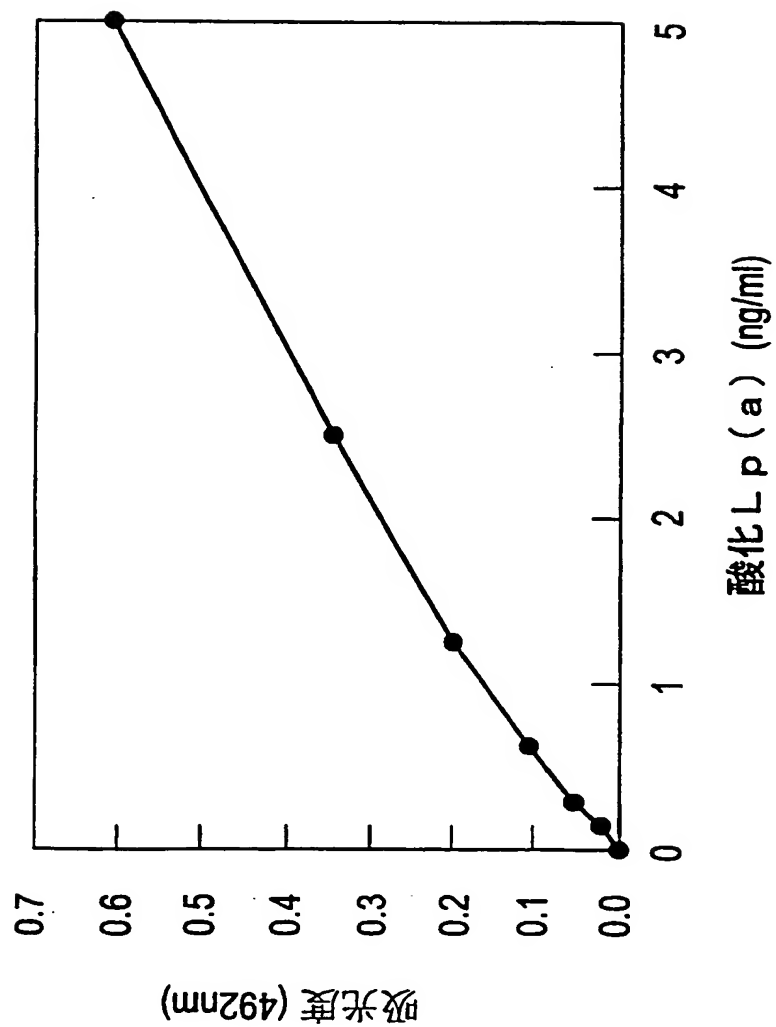
4/10

第4図



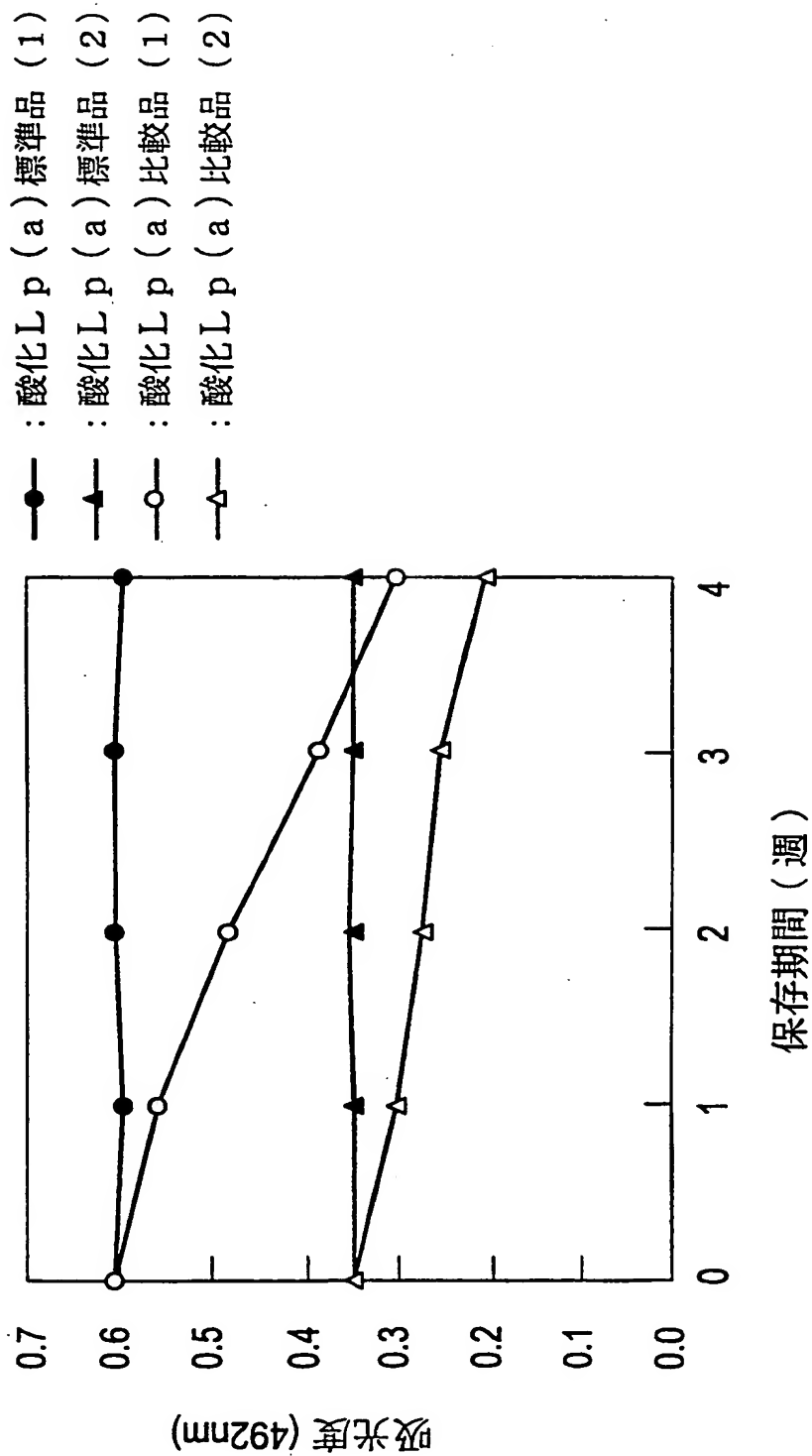
- 5 / - 1 0

第5図



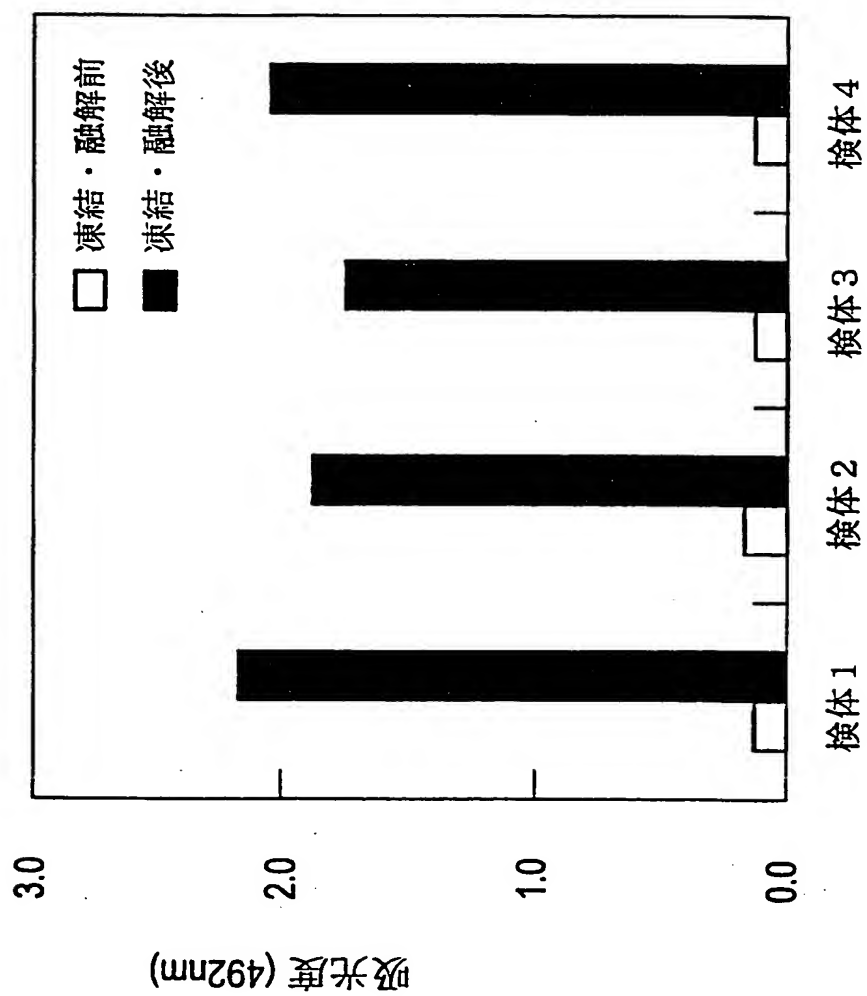
6 / 10

第6図



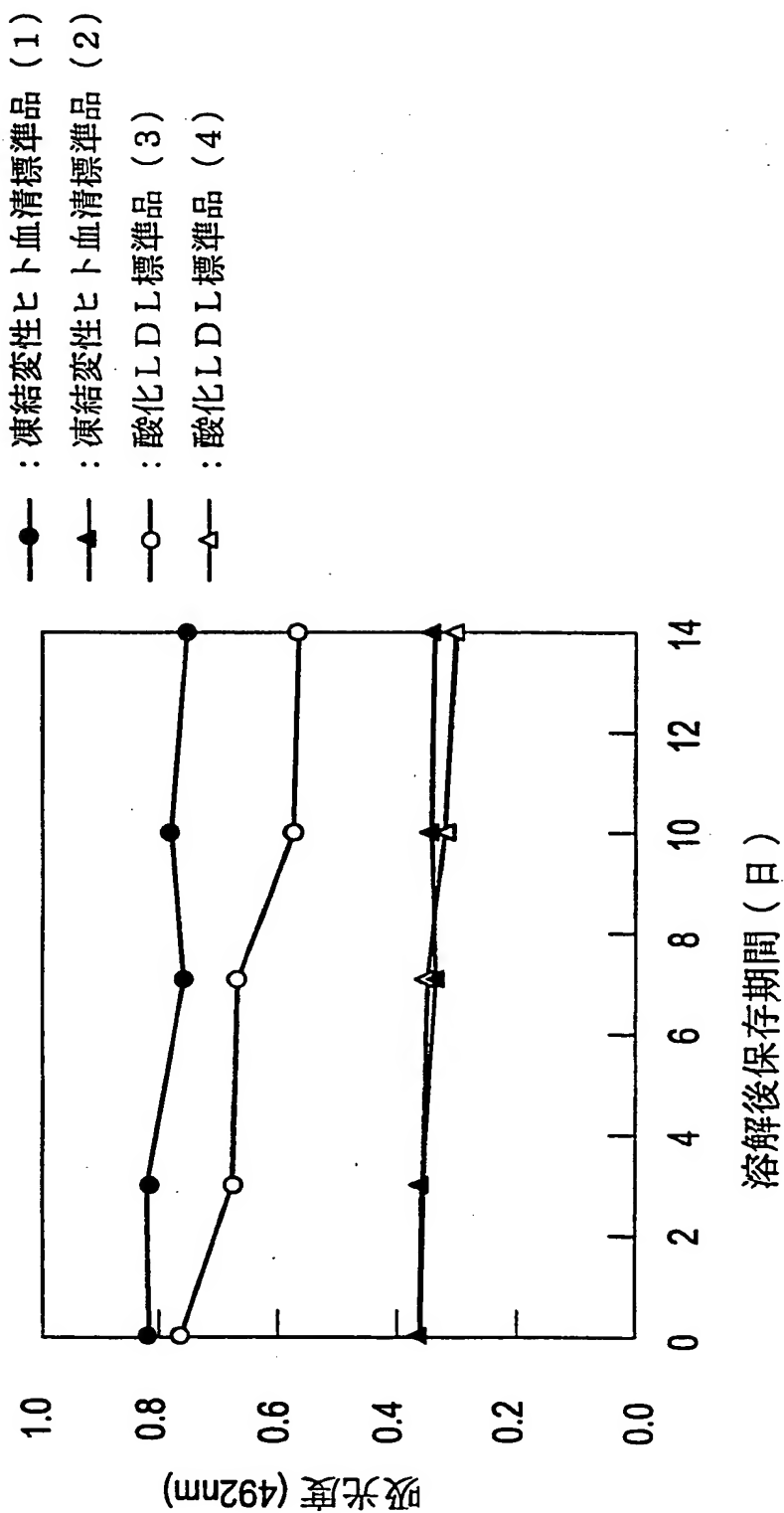
7/10

第7図



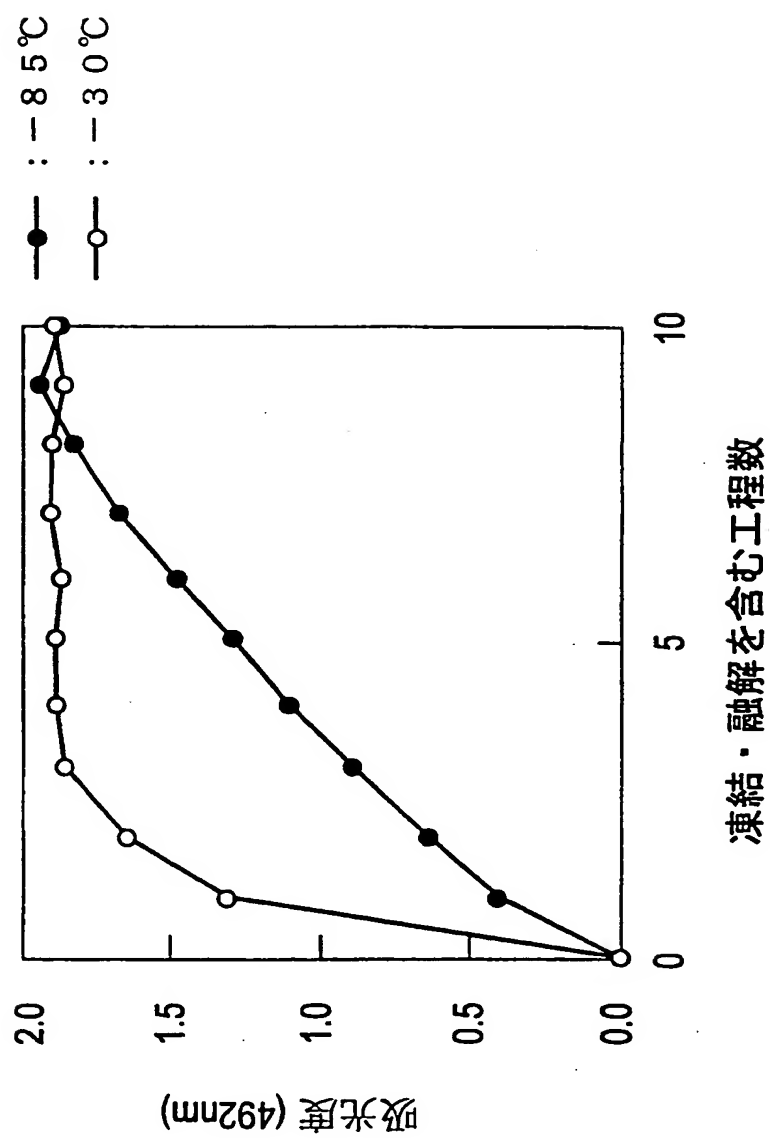
8 / 10

第8図



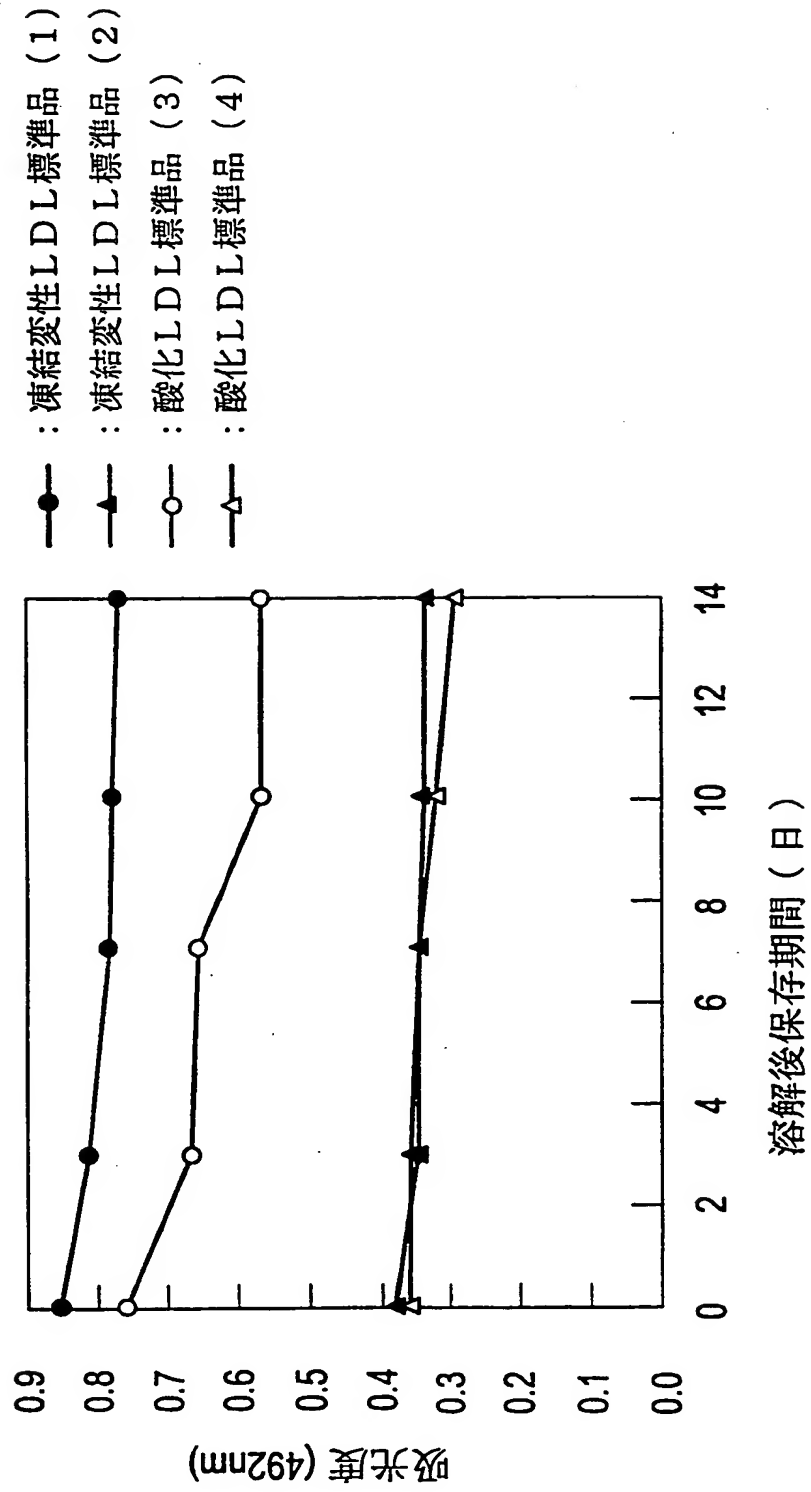
- 9 / - 1 - 0

第9図



10 / 10

第10図



A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl' C07K 14/775, G01N 33/92 // C07K 16/18

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl' C07K 14/775, G01N 33/92, C07K 16/18

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JICSTファイル(JOIS), WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP, 9-297137, A (株式会社シノテスト) 18.11月.1997 (18.11.97) ファミリーなし	1-21
Y	Murakami, M et al. "Distinction in the mode of receptor-mediated endocytosis between high density lipoprotein and acetylated high density lipoprotein : evidence for high density lipoprotein receptor-mediated cholesterol transfer", J.Biochem. (1987), Vol.101, No.3, p.729-741	1-21

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

22.08.00

国際調査報告の発送日

05.09.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

六笠 紀子

印

4B

9735

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	EP, 663407, A1 (ROTKREUZSTIFTUNG ZENT LAB BLUTSPENDE) 19. 7月. 1995 (19. 07. 95) & US, 5652339, A & NO, 9405101, A & CA, 2138925, A & FI, 9406199, A & CZ, 9403299, A3 & HU, 943830, A & CN, 1108662, A & JP, 7-242699, A	1 - 2 1
A	EP, 617289, A3 (IMMUNO AG) 6. 9月. 1995 (06. 09. 95) & AT, 9300553, A & CA, 2119096, A & JP, 6-300758, A	1 - 2 1
A	Schiele, E. et al. "Feasibility of a recombinant human apolipo- protein E reference material", Fresenius J. Anal. Chem. (1998), Vol. 360 , No. 3/4 , p. 501-504	1 - 2 1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/03413

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C07K 14/775, G01N 33/92 // C07K 16/18

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C07K 14/775, G01N 33/92, C07K 16/18

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JICST FILE (JOIS), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP, 9-297137, A (Shinotesuto K.K.), 18 November, 1997 (18.11.97) (Family: none)	1-21
Y	Murakami, M et al., "Distinction in the mode of receptor-Mediated endocytosis between high density lipoprotein and acetylated high density lipoprotein : evidence for high density lipoprotein receptor-mediated cholesterol transfer", J.Biochem. (1987), Vol.101, No.3, pp.729-741	1-21
Y	EP, 663407, A1 (ROTKREUZSTIFTUNG ZENT LAB BLUTSPENDE), 19 July, 1995 (19.07.95) & US, 5652339, A & NO, 9405101, A & CA, 2138925, A & FI, 9406199, A & CZ, 9403299, A3 & HU, 943830, A & CN, 1108662, A & JP, 7-242699, A	1-21
A	EP, 617289, A3 (IMMUNO AG), 06 September, 1995 (06.09.95) & AT, 9300553, A & CA, 2119096, A & JP, 6-300758, A	1-21

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
22 August, 2000 (22.08.00)

Date of mailing of the international search report
05 September, 2000 (05.09.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/03413

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Schiele, E. et al., "Feasibility of a recombinant human apolipo- protein E reference material", Fresenius J.Anal.Chem. (1998), Vol.360, No.3/4, pp.501-504	1-21